

**Vergleichende Untersuchungen  
zur parenteralen und nicht-parenteralen  
Immunisierung gegen Kanarienvpocken**

Hartmut Sailer

1974





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. J. Boch  
Angefertigt unter Leitung von: Prof. Dr. E. Munz

---

Vergleichende Untersuchungen zur parenteralen und  
nicht-parenteralen Immunisierung gegen Kanarienvpocken

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Hartmut Sailer  
aus  
Ichenhausen  
München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

|                    |                           |
|--------------------|---------------------------|
| Dekan:             | Prof. Dr. E. Dahme        |
| Referent:          | Prof. Dr. E. Munz         |
| Korreferent:       | Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr |
| Tag der Promotion: | 22.2.1974                 |



## Inhaltsübersicht

|                                                                                                     | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                                       | 1     |
| 2. Schrifttum: Kanarienvogelgrippe                                                                  | 2     |
| 2.1. Geschichte                                                                                     | 2     |
| 2.2. Erreger                                                                                        | 4     |
| 2.2.1. Klassifikation                                                                               | 4     |
| 2.2.2. Größe                                                                                        | 4     |
| 2.2.3. Struktureller Aufbau                                                                         | 5     |
| 2.2.4. Antigener Aufbau                                                                             | 6     |
| 2.2.5. Prinzip der intrazellulären Synthese                                                         | 6     |
| 2.2.6. Chemisch-physikalische Eigenschaften                                                         | 8     |
| 2.2.7. Differenzierungskriterien                                                                    | 8     |
| 2.3. Epizootologie                                                                                  | 13    |
| 2.4. Pathogenese                                                                                    | 14    |
| 2.5. Klinische Erscheinungen und pathologisch-anatomische Veränderungen                             | 15    |
| 2.5.1. Perakute Verlaufsform                                                                        | 15    |
| 2.5.2. Lungenform                                                                                   | 16    |
| 2.5.3. Haut-Schleimhautform                                                                         | 16    |
| 2.5.4. Tumorform                                                                                    | 18    |
| 2.6. Vorkommen und Verbreitung                                                                      | 18    |
| 2.7. Diagnose                                                                                       | 19    |
| 2.8. Therapie                                                                                       | 20    |
| 2.9. Prophylaxe                                                                                     | 20    |
| 3. Schrifttum: Nicht-parenterale Immunisierungsverfahren gegen Viruserkrankungen in der Tiermedizin | 23    |
| 3.1. Trinkwasservakzine zur Immunisierung gegen die Atypische Geflügelpest (Newcastle-Disease, ND)  | 23    |
| 3.2. Trinkwasservakzine zur Immunisierung gegen die Aviäre Encephalomyelitis (AE)                   | 25    |
| 3.3. Trinkwasservakzine zur Immunisierung gegen die Infektiöse Bronchitis des Geflügels (IB)        | 26    |

|                                                                                                                                                                    | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.4. Trinkwasservakzine zur Immunisierung gegen die Infektiöse Bursitis (Gumborokrankheit)                                                                         | 26    |
| 3.5. Kloakale bzw. konjunktivale bzw. nasale Impfung gegen die Infektiöse Laryngo-Tracheitis des Geflügels (ILT)                                                   | 27    |
| 3.6. Aerosolvakzine zur Bekämpfung der Staupe der Nerze                                                                                                            | 27    |
| 3.7. Intranasale, intravaginale, intrapräputiale Immunisierungsverfahren gegen die Infektiöse bovine Rhinotracheitis/Infektiöse pustuläre Vulvovaginitis (IBR/IPV) | 28    |
| 3.8. Intranasale Vakzination gegen Parainfluenza-3-Infektionen der Rinder                                                                                          | 29    |
| 3.9. Prophylaxe der Pferdeinfluenza durch nasale Impfung und Aerosolvakzinierung                                                                                   | 29    |
| 3.10. Orale Immunisierungsverfahren gegen die Tollwut der Füchse                                                                                                   | 29    |
| 3.11. Orale Immunisierung gegen die Europäische Schweinepest der Wildschweine                                                                                      | 30    |
| 4. Schrifttum: Orale Immunisierungen gegen Pockeninfektionen der Tiere                                                                                             | 31    |
| 4.1. Orale Impfstoffe gegen Hühnerpocken                                                                                                                           | 31    |
| 4.2. Orale Immunisierung von Maus, Kaninchen, Hund, Schwein und Affe mit Vaccinia-Virus gegen eine nachfolgende Vaccinia- bzw. Variola-Infektion                   | 32    |
| 4.3. Orale Immunisierung gegen Mäusepocken                                                                                                                         | 33    |
| 5. Eigene Untersuchungen                                                                                                                                           | 35    |
| 5.1. Material und Methoden                                                                                                                                         | 35    |
| 5.1.1. Abkürzungen                                                                                                                                                 | 35    |
| 5.1.2. Zellkulturen                                                                                                                                                | 35    |
| 5.1.3. Virusstämme                                                                                                                                                 | 36    |
| 5.1.3.1. Virusstämme zur Immunisierung                                                                                                                             | 36    |
| 5.1.3.2. Virusstamm zur Testinfektion                                                                                                                              | 36    |

|                                                                                                        | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 5.1.4. Viruszüchtung                                                                                   | 37    |
| 5.1.5. Titrierungen                                                                                    | 38    |
| 5.1.6. Virustiter                                                                                      | 38    |
| 5.1.7. Prüfung der Impfstoffe auf Thermo-<br>resistenz                                                 | 39    |
| 5.1.8. Virusrückisolierung                                                                             | 39    |
| 5.1.9. Elektronenoptische diagnostische Unter-<br>suchungen                                            | 40    |
| 5.1.10. Versuchstiere                                                                                  | 40    |
| 5.1.11. Impfmethoden                                                                                   | 41    |
| 5.1.11.1. Intraoesophageale Applikation                                                                | 41    |
| 5.1.11.2. Intrakloakale Applikation                                                                    | 41    |
| 5.1.11.3. Vakzinierung über das Trink-<br>wasser                                                       | 41    |
| 5.1.11.4. Spray-Vakzinierung                                                                           | 42    |
| 5.1.11.5. Nasale Impfstoffapplikation                                                                  | 42    |
| 5.1.11.6. Applikation der Impfstoffe in die<br>Federfollikel (kutane Vakzinierung)                     | 42    |
| 5.1.11.7. Intrakutane Impfung nach der<br>Wing-Web-Methode                                             | 43    |
| 5.1.11.8. Intramuskuläre Vakzinierung<br>in die Brustmuskulatur                                        | 43    |
| 5.1.12. Unschädlichkeitsprüfung der Impfstoffe                                                         | 43    |
| 5.1.13. Testinfektionen mit virulentem Virus                                                           | 44    |
| 5.1.14. Bakteriologische Prüfung                                                                       | 44    |
| 5.1.15. Impfplan und Methoden der nicht-parenteralen<br>Immunisierung und Zeitpunkt der Testinfektion: | 44    |
| 5.1.16. Impfplan und Methoden der parenteralen<br>Immunisierung und Zeitpunkt der Testinfektion:       | 46    |
| 5.2. Versuche und Ergebnisse                                                                           | 47    |
| 5.2.1. Ergebnisse der Unschädlichkeitsprüfungen<br>der verwendeten Impfstoffe                          | 47    |
| 5.2.2. Verlauf und Ergebnisse der Testinfektionen<br>nach nicht-parenteralen Immunisierungen           | 47    |
| 5.2.2.1. Intraoesophageale Immunisierung<br>mit dem Stamm KP 1 att.                                    | 48    |

|                                                                                        | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 5.2.2.2. Kloakale Immunisierung mit den<br>Stämmen KP 1 att. und Kanapox <sup>R</sup>  | 49    |
| 5.2.2.3. Nasale Immunisierung mit dem<br>Stamm Kanapox <sup>R</sup>                    | 49    |
| 5.2.2.4. Immunisierung über das Trinkwasser                                            | 49    |
| 5.2.2.5. Spray-Vakzination mit den Stäm-<br>men KP 1 att. und Kanapox <sup>R</sup>     | 50    |
| 5.2.3. Verlauf und Ergebnisse der Testinfektionen<br>nach parenteralen Immunisierungen | 51    |
| 5.2.3.1. Kutane Immunisierung nach der<br>Federfollikel-Methode                        | 51    |
| 5.2.3.2. Intrakutane Immunisierung nach<br>der Wing-Web-Methode                        | 53    |
| 5.2.3.3. Intramuskuläre Impfstoffappli-<br>kation des Stammes KP 1 att.                | 53    |
| 5.3. Besprechung der Ergebnisse                                                        | 55    |
| 5.4. Zusammenfassung                                                                   | 63    |
| 5.5. Literaturverzeichnis                                                              | 67    |

1. Einleitung:

Die Pocken der zu den Familien der Finken (Fringillidae) und der Webervögel (Ploceidae) gehörenden Vögel stellen wegen ihrer Infektiosität und hohen Mortalität eine ernsthafte Gefährdung dieser Tiere in vielen Ländern der Erde dar.

Seit einigen Jahren kann gegen diese Krankheit erfolgreich geimpft werden. Der Impfstoff, dessen wirksames Prinzip auf einem attenuierten Kanarienvogelpockenvirus beruht, wird hauptsächlich zur Immunisierung von Kanarienvögeln eingesetzt, wo man ihn nach der sogenannten "Wing-Web-Methode" appliziert. Dazu ist es nötig, jeden Vogel einzeln in die Hand zu nehmen. Zur notwendigen Kontrolle des Impferfolges muß das Einzeltier 10 Tage nach der Vakzinierung auf die Ausbildung von Impfpocken überprüft, also erneut gefangen und untersucht werden. Für größere Zuchtbestände bedeutet dieses Impfverfahren naturgemäß arbeitstechnisch eine große Belastung, ganz abgesehen von dem Streß und der Verletzungsgefahr, die mit dem Fangen der wertvollen Ziervögel verbunden sind. Aufgabe vorliegender Arbeit war es, vergleichend zu prüfen, ob auch noch andere ebenso sichere, aber einfacher anwendbare Impfmethoden möglich sind.

2. Schrifttum: Kanarienspocken

2.1. Geschichte:

Das Vorkommen pockenartiger Erkrankungen bei Sperlingen, Finken und Kanarienvögeln ist seit geraumer Zeit bekannt. So beschrieb schon 1898 Shattock (69) das Auftreten von Hautpocken bei Sperlingen. Aber erst als Lahaye (47) 1930 über ein "Sperlingspockenvirus" berichtete, das er als Ursache für eine Pockenerkrankung bei Kanarienvögeln ansah, fand diese Erkrankung wieder größeres wissenschaftliches Interesse. Der Erreger war für Kanarienvogel und Buchfinken pathogen, jedoch nicht für Tauben und Hühner.

1932 beschrieben Eberbeck und Kayser (18) pockenartige Veränderungen am Kopf eines Kanarienvogels. Die kutane Verimpfung von Material aus diesen Veränderungen auf andere Kanarienvögel führte zu einer deutlichen Schwellung der Follikel, in denen "eindeutig Geflügelpockenkörperchen", d.h. intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen, festzustellen waren.

Im gleichen Jahr machten Kikuth und Gollub (43) auf eine bei Kanarienvögeln aufgetretene Krankheit aufmerksam, die unter dem Bild einer Septikämie verlaufen und mit Atembeschwerden einhergegangen war. Als pathologische Veränderungen imponierten besonders Ödeme der Brustmuskulatur. Wir wissen heute, daß es sich hierbei um eine besonders gefährliche Verlaufsform der Kanarienspocken gehandelt hat, die in der Regel klinisch keinen Bezug zur Hautform erkennen läßt. Die Ätiologie dieser Septikämie war zunächst nicht eindeutig klar. Den Autoren fielen im Blut der erkrankten Tiere sogenannte "X-Körperchen" auf, die sie als

veränderte Blutplättchen ansprachen. Herzberg (30) betrachtete diese Gebilde dagegen als den Erreger dieser "Kanarienvogelkrankheit". In späteren Untersuchungen bezeichnete er sie als "virushaltige histiozytäre Zellen".

Die wahre Natur des "Kikuth'schen Kanarienvogelvirus" - so hatte man den Erreger der Kanarienvogelkrankheit genannt - beschrieb 1935 Gaede (20) in Kenntnis der Ergebnisse von Burnet und Barnard (8). Letztere hatten bereits auf die starke Ähnlichkeit dieses Virus mit den anderen Geflügelpockenerregern und auf die Veränderungen hingewiesen, welche das "Kanarienvogelvirus" auf der Chorio-Allantois-Membran (CAM) hervorruft. Sie hatten ferner gefunden, daß eine intramuskuläre Verimpfung des Virus für Kanarienvögel immer tödlich war, und daß Immunisierungsversuche mit inaktiviertem Virus erfolglos geblieben waren. Gaede verglich nun den Erreger der von Eberbeck und Kayser beschriebenen Hautform mit dem "Kikuth'schen Kanarienvogelvirus". Dazu verimpfte er den von Eberbeck und Kayser regelmäßig kutan weiterpassierten Kanarienspockenstamm intrakutan und intramuskulär auf Kanarienvögel. Nach intramuskulärer Applikation konnte er das Krankheitsbild der Kikuth'schen Kanarienvogelkrankheit reproduzieren; nach intrakutaner Verimpfung entstanden Hautpocken. Gaede schloß daraus auf die Identität des Kanarienspocken- mit dem Kanarienvogelvirus.

Die Zugehörigkeit dieses Erregers zu den Vogelpocken und seine Selbständigkeit unter diesen bewiesen dann endgültig 1936 Burnet und Lush (9) durch den Nachweis immunologischer Unterschiede zwischen Hühner- und Kanarienspockenviren.

In neuester Zeit wurden schließlich die Kenntnisse über das Kanarienvogelpockenvirus (KPV) durch die Untersuchungen von Mayr et al. (50, 51, 52, 54, 58) und Kraft (46) zur Kultivierung und Differenzierung der Species des Genus "Avipoxvirus" noch ergänzt, nachdem bereits Herzberg und Mitarbeiter (31, 32, 33, 34) die Morphologie des KPV geklärt und damit endgültig seine Zugehörigkeit zu den Pockenviren belegt hatten.

## 2.2. Erreger:

### 2.2.1. Klassifikation:

Das KPV wird innerhalb der Familie der Pockenviren als eigene Species dem Genus Vogelpockenviren (Avipox) zugeordnet (58). Man unterscheidet bei den Vogelpockenviren folgende selbständige Species:

- |                               |                           |
|-------------------------------|---------------------------|
| a) Hühnerpocken-Virus         | = Avipoxvirus gallinae    |
| b) Taubenpocken-Virus         | = Avipoxvirus columbae    |
| c) Putenpocken-Virus          | = Avipoxvirus meleagris   |
| d) Kanarienvogelpocken-Virus  | = Avipoxvirus serinae     |
| e) Wachtelpocken-Virus        | = Avipoxvirus coturnicis  |
| f) Zwergpapageienpocken-Virus | = Avipoxvirus agapornidis |

### 2.2.2. Größe:

Wie alle Pockenviren gehören auch die Vogelpockenviren zu den größten Virusarten. Sie sind sogar noch etwas größer als die Species des Genus "Orthopoxvirus". Elektronenoptische Untersuchungen von Herzberg und Kleinschmidt (33) ergaben folgende Dimensionen: lange Achse maximal 390 nm, minimal 220 nm, breite Achse maximal 240 nm, minimal 100 nm. Das Achsenverhältnis bestimmten die Autoren auf 1,4:1,8:3,0.

### 2.2.3. Struktureller Aufbau:

Die Struktur des KPV gleicht wie die anderen Vo-  
gelpockenviren weitgehend der des Vaccinia-Virus.  
Nach Untersuchungen von Grund et al. (23) über  
das Agapornidenpocken-Virus und Purcell et al.  
(63) über das Taubenpocken-Virus dürfte auch  
das KPV-Partikel aus folgenden Anteilen aufge-  
baut sein:

- a) aus einer Hülle,
- b) einem Lateralkörpermantel und
- c) einem Nukleoid (Innenkörper)

Die Hülle besteht aus drei Schichten: eine äußere  
membranartige Grenze (äußere Grenzstruktur) um-  
schließt eine globuläre Mittelschicht, der wie-  
derum eine membranartige Grenzstruktur (innere  
Grenzstruktur) anliegt.

Der Lateralkörpermantel liegt zwischen der inne-  
ren Grenzstruktur und der Nukleoidgrenze; er be-  
steht aus weitgehend homogenem Material, das ent-  
gegen früheren Vorstellungen nicht als definierter  
Körper auf die beidseitigen Mulden des zentralen  
Nukleoidbereichs beschränkt bleibt, sondern einen  
Mantel zwischen Nukleoid- und Partikelgrenzstruk-  
turen bildet.

Der Innenkörper besitzt eine aus drei elektronen-  
dichten mit zwei dazwischengelagerten hellen Schich-  
ten bestehende Grenze. Sein Inhalt wird von höher-  
geordnetem fibrillärem Material gebildet, es ent-  
hält die Virus-DNS.

In einer Schicht zwischen Lateralkörpermantel und  
Nukleoidgrenze wird eine Proteinlage vermutet.

#### 2.2.4. Antigener Aufbau:

Die Antigenstruktur des KPV dürfte wie bei den anderen Species des Genus "Avipoxvirus" komplex sein. Dort hat man komplementbindende, präzipitierende, neutralogene und hämagglutinierende Antigenkomponenten nachgewiesen (19, 21, 58, 66).

#### 2.2.5. Prinzip der intrazellulären                    Synthese:

Der Entwicklungszyklus des KPV gleicht dem der Säugetierpockenviren. Nach Mayr und Mitarbeitern (58) sind bei diesen morphologisch 4 Stadien zu unterscheiden:

- a) Bildung von dichten, filamentösen Elementen in der Größenordnung von  $15 - 40 \text{ \AA}$  ca. 3 - 6 Stunden p.i..
- b) Formation runder bis ovaler, hohler Körper von der Größe des später entstehenden Nukleokapsids etwa 5 - 6 Std. p.i.. Sie bestehen aus einer äußeren und einer inneren Membran und im Innern aus filamentösem Material.
- c) Als dritte Stufe gelten ähnlich aufgebaute, sphärische bis ovale Körper, die aber schon eine gute, von der Umgebung deutlich abgegrenzte Verdichtung im Innern im Sinne eines Nukleoids haben.
- d) Im 4. Stadium sind dann reife, infektiöse Viruspartikel mit typischem Aufbau nachweisbar. Dies ist beim Vacciniavirus frühestens ca. 6 Stunden p.i. der Fall.

Während dieser 4 Stadien laufen folgende biochemische, intrazelluläre Prozesse ab:

Nach der Adsorption an die Zelloberfläche und Penetration des Virus in die Zelle werden die peripheren Partikelbausteine durch das sogenannte "uncoating encyme" abgebaut. Dies führt zur Freisetzung des Innenkörpers. Unter Mitwirkung einer DNS-abhängigen RNS-Polymerase wird die viruseigene DNS befreit und stabilisiert (1 - 3 Stunden p.i.). Gleichzeitig wird einmal die sogenannte "frühe" virale m-RNS synthetisiert. Sie verbindet sich mit Ribosomen zu Polysomen. Zum anderen bilden sich noch weitere Fröhenzyme wie Thymidinkinase, DNS-Polymerase und Desoxyribonuklease, welche für die Synthese neuer Virus-DNS verantwortlich sind. Diese wird unter Anwesenheit von  $MG^{++}$  stabilisiert. 3 - 6 Stunden p. i. wird die sogenannte "späte" virale m-RNS gebildet, die sich wiederum mit Ribosomen zu Polysomen verbindet und insbesondere die Proteinbildung anregt. Erst dann werden die an getrennten Orten innerhalb der Zelle hergestellten Proteine und die DNS zum fertigen Viruspartikel zusammengebaut (ab 6 Stunden p.i.). Zur Ausschleusung des Erregers kommt es dann etwa 8 Stunden p.i..

Die Virussynthese geht bei den Vogelpockenviren langsamer vonstatten als bei den Viren des Genus Orthopox.

Die Unterschiede zwischen den beiden Genera im zeitlichen Ablauf lassen sich nach Beimpfung der Chorioallantoismembran (CAM) 10 Tage alter embryonierter Hühnereier makroskopisch nachweisen. Hier beträgt die Latenzzeit für das Erscheinen erster Veränderungen beim Vacciniavirus 20 Stunden, eine Generalisierung findet bereits 48 - 110 Stunden p.i. statt. Bei den Vogelpockenviren sind dagegen CAM-Läsionen erst nach 48 - 72 Stunden sichtbar, eine Generalisierung erfolgt erst zwischen dem 5. und 9. Tag p.i.. Ähnliche Unterschiede lassen sich auch bei der Infektion von Kulturen aus Hühnerembryofibroblasten (FHE) feststellen. Das Vaccinia-Virus führt sehr schnell zur vollständigen Zerstörung der Kultur, während zytopathische Veränderungen von Vogelpockenviren langsamer entstehen.

#### 2.2.6. Chemisch-physikalische Eigenschaften:

In seinem chemisch-physikalischen Verhalten gleicht das KPV den anderen Vogelpockenviren: Es ist DNS-haltig, Glyzerin-resistent und verhältnismäßig widerstandsfähig gegenüber Formalin und Phenol. Wegen seines hohen Lipidgehalts wird es jedoch von Chloroform und Äther schnell inaktiviert. Dieser begründet letztlich auch die Unterschiede in der Morphologie und Färbbarkeit der intrazytoplasmatisch gelegenen Einschlusskörperchen der Vogelpockenviren (Bollinger'sche Einschlusskörperchen) gegenüber den anderen Pockenviren. Die Einschlusskörperchen nach einer Infektion mit Vogelpockenviren sind größer, färben sich mit Fettfarbstoffen und werden dem Typ A zugeordnet.

Der optimale pH-Wert für das Virus liegt zwischen 5 und 9. Im sauren Bereich wird das Virus schneller inaktiviert als im alkalischen.

Das Virus ist relativ wärmelabil, bei 55° C wird es in einer Stunde inaktiviert, bei niedrigeren Temperaturen ist es jedoch wesentlich stabiler. Optimale Temperaturen zur Konservierung liegen unter - 20° C. Entscheidend für den Erhalt der Aktivität in Suspensionen ist die Art des Suspensionsmediums. Ein Zusatz von 2,5 % Gelatine oder 1 % Magermilch bewirken eine deutliche Stabilisierung der Infektiosität über einen längeren Zeitraum (53).

#### 2.2.7. Differenzierungskriterien:

Pockenvirus-Genera und -Species werden überwiegend aufgrund unterschiedlicher biologischer Eigenschaften klassifiziert (29). Die wichtigsten Unterscheidungskriterien zwischen dem Genus Avipoxvirus und den anderen Genera der Familie Poxviridae sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1:

Differenzierungskriterien zwischen dem Genus  
Avipoxvirus und den anderen Genera der Familie  
Poxviridae (nach Mayr et al. (58), modif.)

| Merkmal                          | Genus                  |                         |                                     |                            |                           |
|----------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                                  | Orthopox-virus         | Avipox-virus            | Ungulopox-virus                     | Lepopox-virus              | Entomopox-virus           |
| Natürlicher Wirt                 | Mensch u. Säugetiere   | Vögel                   | Wieder-käuer                        | Leporiden                  | Insekten                  |
| Vermehrung in Zellkulturen       | Säuger- u. Vogelzellen | nur in aviären Zellen   | nur in Zellen v. Rind, Schaf, Ziege | nur in Zellen v. Kaninchen | bestimmte Insektenzellen  |
| Züchtung auf der CAM             | gut                    | gut                     | schlecht                            | schlecht                   | nein                      |
| Züchtung im kleinen Versuchstier | verschiedene Arten     | Küken                   | nein                                | Leporiden                  | nein                      |
| Größe                            | ca. 360 x 240 nm       | ca. 390 x 260 nm        | ca. 330 x 220 nm                    | ca. 290 x 200 nm           | ca. 400 x 280 nm          |
| Form                             | Quader                 | mehr abgerundete Quader | Quader                              | Quader                     | stark abgerundeter Quader |
| Typ A - Einschlusskörper         | im allg. basophil      | lipophil                | basophil                            | basophil                   | ähnlich den Polyedren     |
| Sedimentationskonstante (Virion) | 65 S                   | 80 S                    | unbekannt                           | unbekannt                  | unbekannt                 |
| DNS - Eigenschaften              | MG: $160 \times 10^6$  | MG: $220 \times 10^6$   | nicht bekannt                       | nicht bekannt              | nicht bekannt             |

Zur Differenzierung der einzelnen Species des Genus Avipox-Virus sind nach Mayr (54) folgende Methoden möglich und anwendbar: Der Tierversuch, die Züchtung auf der CAM und in Zellkulturen, Kreuzimmunitäts- und Kreuzneutralisationsteste, Präzipitationsreaktionen, die Immunofluoreszenztechnik und nach Tripathy et al. (70) bis zu einem gewissen Grade auch die passive Hämagglutination (vgl. Tabelle 2).

Demnach unterscheidet sich das KPV von den anderen Vogelpockenviren durch folgende Kriterien:

- a) Im Tierversuch verursacht nur das KPV nach intramuskulärer Verimpfung im Kanarienvogel eine schwere, generalisierte Erkrankung.

Die anderen Vogelpockenviren rufen auch bei kutaner Applikation keine Reaktion beim Kanarienvogel hervor. Giddens et al. (22) beobachteten jedoch Lokalreaktionen ohne ernsthafte Folgen nach kutaner Infektion mit KPV bei Taube, Huhn und Truthahn. Auch Mayr et al. (55) erwähnen lokale Pockenläsionen bei Eintagsküken. Die strenge Wirtsspezifität des KPV ist demnach noch nicht völlig gesichert. Weitere Untersuchungen müßten klären, ob Passagen in heterologen Wirten, deren Immunstatus eindeutig bestimmt ist, zu einer Änderung der pathogenen Eigenschaften verschiedener KPV-Stämme führen.

- b) Bei der Züchtung auf der CAM bildet das KPV typische, wabig aufgebaute, gelblich gefärbte, dicke schwartige Herde mit starker Generalisierungstendenz ab dem 5. Tag p.i.. Diese Tendenz zur Generalisierung fehlt bei den durch Taubenvogelpockenviren hervorgerufenen, ähnlich aussehenden Herden fast völlig.

Tabelle 2:

Möglichkeiten zur Differenzierung der Species des Genus Avipoxvirus

| Species                          | Verhalten<br>im Tier-<br>versuch                                                                      | Art der<br>CAM-Läsi-<br>onen<br>6.Tag p.i.                                                            | zpE in<br>der<br>Zellkul-<br>tur                                                | Plaque-<br>Morpholo-<br>gie                                           | Verhalten<br>im Kreuz-<br>neutralisa-<br>tionstest                      | Verhalten<br>im Kreuz-<br>immunitäts-<br>test      |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Hühner-<br>pocken-<br>virus      | Eintags-<br>küken i.<br>v.:schwe-<br>re gene-<br>ral, Erkr.<br>Ente i.v.<br>(-)                       | breit,<br>kompakt,<br>starke Ge-<br>neralisie-<br>rung, weiß-<br>lich ge-<br>färbt                    | deutliche<br>Abkuge-<br>lung d.<br>Zellen,<br>langsam<br>verlaufen-<br>de Lysis | helles<br>Zentrum,<br>weniger<br>helle pe-<br>riphäre<br>Zone         | HP-Serum(+)<br>PP-Serum(+)<br>übrige (-)                                | Küken (+)<br>Puten (+)<br>übrige (-)               |
| Puten-<br>pocken-<br>virus       | Eintags-<br>küken i.v.<br>milde, ge-<br>neral, Er-<br>krank. (En-<br>te i.v.:<br>milde Er-<br>krank.) | ähnlich<br>Hühner-<br>pocken                                                                          | wie Hüh-<br>ner-<br>pocken                                                      | ähnlich<br>Hühner-<br>pocken,<br>Plaques<br>entstehen<br>langsamer    | wie Hühner-<br>pocken                                                   | Küken (+)<br>Puten (+)<br>Tauben (+)<br>übrige (-) |
| Tauben-<br>pocken-<br>virus      | Eintags-<br>küken i.<br>v. (-)<br>Entei.v.<br>(-), Wachtel<br>follikulär (+)                          | dick,<br>schwartig,<br>keine Ge-<br>neralisie-<br>rung                                                | Abkuge-<br>lung d.<br>Zellen<br>spät,<br>schnell<br>verlaufen-<br>de Lysis      | fast<br>durchsich-<br>tiges Zen-<br>trum, meh-<br>rere Ring-<br>zonen | HP-Serum(-)<br>PP-Serum(-)<br>TP-Serum(+)<br>übrige (-)                 | wie Puten-<br>pockenvirus                          |
| Kanarien-<br>pocken-<br>virus    | Kanarien-<br>vogel i.m.<br>schwere,<br>general.<br>Erkr.<br>übrige(-)                                 | dick,<br>schwartig,<br>gelb ge-<br>färbt,<br>wabiger<br>Aufbau,<br>starke Ge-<br>neralisi-<br>sierung | Abkuge-<br>lung<br>undeutl.,<br>starke<br>Granulie-<br>rung d.<br>Zellen        | vakuoli-<br>siertes<br>Zentrum,<br>mehrere<br>Ringzo-<br>nen          | KP-Serum(+)<br>übrige (-)                                               | Kanarien-<br>vogel (+)<br>übrige (-)               |
| Wachtel-<br>pocken-<br>virus     | Wachtel-<br>follikulär:<br>milde, z.<br>Teil ge-<br>neralis.<br>Erkrankg.<br>übrige(-)                | sehr klei-<br>ne Herde,<br>keine Ge-<br>neralisie-<br>rung                                            | --                                                                              | --                                                                    | WP-Serum(+)<br>PP-Serum(?)<br>übrige (-)                                | Wachtel(+)<br>übrige (?)                           |
| Agaporniden-<br>pocken-<br>virus | Agaporniden<br>kutan: generalis.<br>Pocken<br>übrige(-)                                               | gelbliche<br>käsige<br>Herde mit<br>zentraler<br>Nekrose<br>starke Ge-<br>neralisie-<br>rung          | ähnlich<br>Hühner-<br>pocken,<br>raschere<br>Vermeh-<br>rung                    | sehr gros-<br>se Pla-<br>ques mit<br>scharfem<br>glattem<br>Rand      | AP-Serum(+)<br>HP-Serum(+)<br>TP-Serum(+)<br>PP-Serum(+)<br>KP-Serum(+) | ?                                                  |

Zeichenerklärung:

|   |                                               |    |                |    |                     |
|---|-----------------------------------------------|----|----------------|----|---------------------|
| + | = positiv                                     | HP | = Hühnerpocken | KP | = Kanarienvpocken   |
| - | = negativ                                     | PP | = Putenpocken  | WP | = Wachtelpocken     |
| ? | = noch nicht be-<br>kannt                     | TP | = Taubenpocken | AP | = Agapornidenpocken |
| ± | = zu einem gewis-<br>sen Grad (unter<br>40 %) |    |                |    |                     |

- c) In Zellkulturen aus Hühnerembryofibroblasten zeigt das KPV von allen Vogelpockenviren den am schnellsten auftretenden zytopathischen Effekt (zpE). Er ist weniger durch eine Abkugelungsphase als vielmehr durch eine Granulierung und Lysis gekennzeichnet. Charakteristisch ist, daß auch geringste Infektionsdosen die Kultur völlig zerstören. Plaques besitzen ein typisches, vakuolisiertes oder wabenförmig aufgebautes, mehr oder weniger helles Zentrum. Die Plaques sind größer als die des Taubenpockenvirus; sie zeigen ferner ein deutliches Ringzonenphänomen im Gegensatz zu denen des Hühnerpocken- oder Putenpockenvirus. Tripathy und Mitarbeiter (70) bestreiten jedoch das Vorkommen differentialdiagnostisch verwertbarer morphologischer Charakteristika der von den Species des Genus Avipox hervorgerufenen Plaques in Zellkulturen und der CAM-Läsionen.
- d) Im Neutralisationstest (in vitro und auf der CAM) neutralisieren gegen das KPV gerichtete Antikörper andere Species des Genus Avipox nicht, wie auch umgekehrt deren Immunseren nicht das KPV neutralisieren. Heterologe Mitreaktionen können jedoch dabei beobachtet werden (70).
- e) Mittels der Präzipitationsreaktion im Agargel läßt sich ebenfalls die Artzugehörigkeit der einzelnen Vogelpockenviren ermitteln.
- f) Als sicherstes Kriterium zur Differenzierung zählt der Kreuzimmunitätstest. Zu keinem anderen Vogelpockenvirus besteht eine Kreuzimmunität.

2.3. Epizootologie:

Bei der natürlichen Infektion wird das Virus direkt von Tier zu Tier oder indirekt durch leblose oder belebte Vektoren übertragen. Die direkte Übertragung erfolgt als Tröpfcheninfektion, ausgehend von kranken, von latent infizierten und von solchen Tieren, die sich in der Inkubationszeit befinden (65). Bei der indirekten Übertragung spielen als leblose Vektoren mit Virus verunreinigtes Trinkwasser, Futter und Verunreinigungen der Ställe etc. eine große Rolle. Es ist denkbar, daß als belebte Vektoren auch Insekten, und selbst der Mensch das Virus rein mechanisch verschleppen können.

Künstlich läßt sich der Erreger nicht nur parenteral (intramuskulär, intrakutan, intraperitoneal, intracerebral), sondern auch peroral übertragen (43). Bei peroraler Übertragung ist sowohl die Inkubationszeit als auch die Krankheitsdauer wesentlich verlängert.

Die Inkubationszeit beträgt bei künstlicher parenteraler Infektion 4 - 14 Tage, bei natürlicher dauert sie wesentlich länger. Bei peroraler Virusaufnahme wird sie mit bis zu 52 Tagen angegeben.

Die Ausscheidung des Virus von infizierten Vögeln erfolgt bei Vorliegen von Hautpocken über den Pokkenausschlag, bei der septikämischen Verlaufsform über das Augen- und besonders durch katarrhalisches Sekret. Die Virusausscheidung über die Kloake spielt anscheinend epidemiologisch keine Rolle (66). Latent infizierte Vögel beherbergen nach Kirmse (44) den Erreger bis zu 13 Monaten. Auf diese Weise können verlustreiche Ausbrüche bei

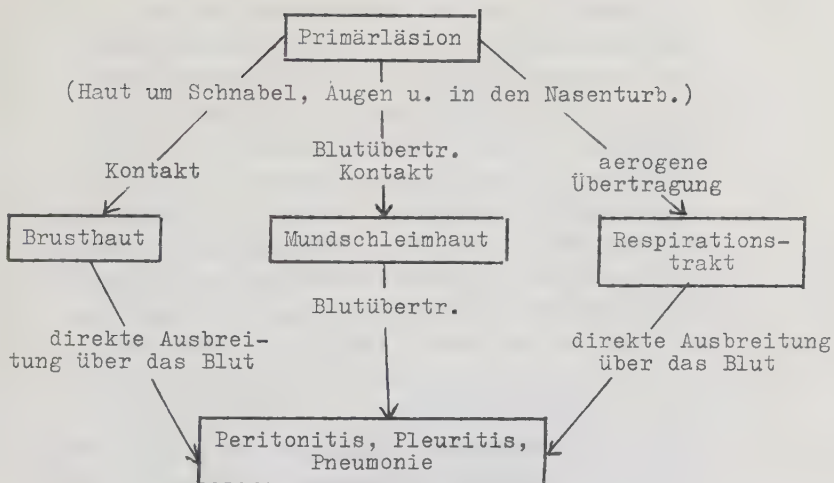
Beständen entstehen, wenn Wildfänge aufgenommen werden. Das Vorkommen echter latenter Infektionen ist jedoch nicht gesichert.

#### 2.4. Pathogenese:

Die Erkenntnisse über die Pathogenese der Hühnerpocken (49) lassen Analogieschlüsse zu den Kanarienvpocken zu. Danach verlaufen bestimmte Formen der KP möglicherweise wie eine zyklische, durch zwei Virämienstadien geprägte Infektionskrankheit:

Bei der natürlichen septikämischen Form gelangt das Virus wahrscheinlich vom Nasen-Rachenraum aus über eine erste Virämie zu den primär affinen Organen (Leber, Knochenmark), wo es zu einer starken Virusmehrung kommt, die über ein zweites Virämiestadium zur Organmanifestation (Haut, Muskulatur, Schleimhaut, Lunge) und damit zum Ausbruch der Krankheit führt. Bei der kutanen Verlaufsform scheint sich der Erreger nur örtlich anzusiedeln; zu einer allgemeinen Erkrankung kommt es nicht oder nur selten.

Für diese Hypothese gibt es allerdings noch keine Beweise. Giddens et al. (22) glauben, daß Primärläsionen in der Epidermis um Schnabel und Augen und in den Nasentubinalien entstehen. Von dort aus breitet sich die Infektion durch Kontakt, Inhalation und über das Blut aus, wobei der Tod eintreten kann, ohne daß es zu einem vollen Spektrum der Symptomatik gekommen ist. So wird zum Beispiel angenommen, daß die bei Sperlingen beobachtete schwere ulcerative Dermatitis der Brust und Axillarregion dadurch entstand, daß die Vögel bei kaltem Wetter ihren mit primären Läsionen bedeckten Kopf unter den Flügeln verstecken und damit kutan die Brusthaut infizieren. Die Autoren vermuten aufgrund der heutigen Kenntnisse folgendes Schema für das Fortschreiten von Veränderungen bei KP angeben zu können:



## 2.5. Klinische Erscheinungen und pathologisch anatomische Veränderungen:

Die für die Pockenerkrankung des Nutzgeflügels übliche Einteilung in eine Haut-, eine Schleimhaut- und eine gemischte Form ist für KP weniger geeignet. Während de Bliek (7) Pocken der Haut und eine "Septikämie ohne oder mit sehr geringfügiger Pockenbildung, bisweilen aber mit Pneumonie als Begleiterscheinung" unterscheidet, teilt Hartig (25) die Pocken der Kanarienvögel in eine perakute Verlaufsform, in die Lungenform, in eine Haut-Schleimhautform und eine Tumorform ein. Dabei können Lungen- und Haut-Schleimhautform ineinander übergehen.

- 2.5.1. Bei der perakuten Verlaufsform tritt in der Regel der Tod so rasch ein, daß es kaum zu vorher auffallenden klinischen Erscheinungen und charakteristischen pathologisch-anatomischen Veränderungen in Form von petechialen Blutungen an Herzmuskel, Lungen und serösen Häuten kommt.

- 2.5.2. Die Lungenform verläuft unter dem Bild der "Schnappkrankheit", d.h. die Vögel sitzen mit gesträubtem Gefieder auf dem Käfigboden, ringen angestrengt nach Luft und sperren deshalb den Schnabel weit auf. Die Atemnot wird durch eine Bronchopneumonie hervorgerufen, die von einer fibrino-purulenten Exsudation in die Luftwege begleitet ist. Die makroskopischen Veränderungen an den Lungen bestehen aus herdförmigen, stecknadelkopf- bis linsengroßen, vorgewölbten Bezirken von blauroter Farbe und fester Konsistenz (26). Histologisch imponieren mächtige adenomatoide Epithelproliferationen in den Bronchien und Alveolarsepten. In den proliferierten und transformierten Epithelien sind die mit Fettfarbstoffen darstellbaren, intrazytoplasmatisch gelegenen Einschlusskörperchen nachweisbar. In der Regel kommt es bei dieser Verlaufsform innerhalb von 2 - 3 Tagen nach Ausbruch der Erkrankung zum Exitus der Tiere.
- 2.5.3. Die Haut- Schleimhautform der KP gleicht dem vom Geflügel her bekannten Bild einer Pockeninfektion. Nach Giddens et al. (22) sind dabei die ersten klinischen Erscheinungen Anorexie und Apathie. Hautläsionen treten meist um die Augen und/oder an der Schnabelbasis auf. Sie äußern sich in einer proliferativen Dermatitis. Mitunter treten Läsionen auch in der Axillargegend und an der Brust auf, um sich von hier aus über den ganzen Körper zu verbreiten, wobei auch die Subkutis und Skelettmuskulatur befallen werden. Zu ausgedehnten Ulcerationen kann es durch bakterielle und pilzbedingte Sekundärinfektion kommen. Die erkrankten Körperpartien sind ödematös verändert, federlos und nach dem Antrocknen der ausgetretenen Exsu-

dates dick verkrustet. In der Ödemflüssigkeit läßt sich ein hoher Virusgehalt nachweisen. Die Schleimhautveränderungen bestehen aus Pseudomembranen auf der Zunge und am Pharynx-Eingang (40). Sie werden jedoch nur selten beobachtet. Sogenannte "Fußpocken" konnten bei natürlichen Infektionen nicht beobachtet werden, während sie bei künstlich infizierten Vögeln als proliferative Pododermatitis dann immer wieder auftraten, wenn sie wenigstens 14 Tage die Krankheit überstanden.

Die histopathologischen Veränderungen bestehen anfangs aus einer Verdickung der Epidermis infolge Schwellung und Proliferation der Zellen, die nicht mehr keratinisieren. Befallene Epithelzellen sind durch eine Schwellung des Zytoplasmas, sehr oft durch sudanophile Plasmavakuolen und seltener durch eosinophile Einschlüßkörperchen charakterisiert. Letztere sind bis  $8\mu$ m groß und teilweise granuliert. Häufig kann das gesamte Plasma mit granulären Massen gefüllt sein. Besonders schwere hyperplastische und hypertrophe Epithelveränderungen werden bei den Federfollikeln der Brust beobachtet. Sie scheinen für den Federverlust verantwortlich zu sein (22).

Darüber hinaus kommt es zu Ödem- und Blasenbildung am Epithelgrund (Basalmembran), die zu Desquamation der Epithelschichten, Entzündungen und Ulcerationen führen.

Die Veränderungen der respiratorischen Schleimhaut sind ähnlich, wenn es auch weniger zu Desquamationen und Ulcerationen zu kommen scheint. Sie beginnen in der Nasenhöhle und erreichen schließlich über die Trachea die Bronchien und Luftröhre. Giddens et al. (22) beobachteten im Verlauf von fortgeschrittenen Fällen von Haut-Schleimhautformen auch eine proliferative Peritonitis und intrazytoplasmatische, hyaline Einschlüsse im tubulären Nierenepithel.

Bei gutartigem Verlauf wird die Krankheitsdauer dieser Erscheinungsform mit 2 - 3 Wochen angegeben.

- 2.5.4. Hartig und Frese (27) beschrieben eine tumoröse Form der KP. Es handelte sich dabei um eine halbkugelförmige Neubildung am Flügel eines Kanarienvogels. Sie besaß eine zentral eingedellte Oberfläche, einen Durchmesser von 8 mm und eine ockerfarbige, glänzende, solide Schnittfläche. Die histopathologischen Befunde dieses Tumors glichen weitgehend den bei der Hautform bekannten Veränderungen. Die Art der Epithelproliferationen, das Vorkommen von typischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen sowie der elektronenmikroskopische Nachweis von Pockenviren in veränderten Epithelzellen sicherten die Diagnose. Der Autor rechnet diese Veränderungen den Virustumoren zu.

## 2.6. Vorkommen und Verbreitung:

Die KP treten vor allem bei Vertretern der Familie der Finken auf, so besonders bei Kanarienvögeln und Buchfinken, aber auch bei Zeisigen und Gimpeln wurde die Krankheit beobachtet (5, 22, 25, 45). Ebenfalls kommen sie vor bei Sperlingen, Webervögeln und verschiedenen Drosselarten. Auch bei wertvollen Exoten wurde die Krankheit schon beschrieben (65).

Über die Verbreitung der KP kommen Berichte aus vielen Teilen der Erde, so aus Amerika (6, 10, 22, 45), aus Asien (67) und vielen Ländern Europas (4, 18, 40, 71). Die letzten Berichte über eine weite Verbreitung in der BRD stammen aus den Jahren 1963 und 1964 (3, 24, 25). Nähere

Daten über das derzeitige Vorkommen in der BRD waren leider, auch vom Deutschen Kanarienzüchterbund, nicht zu bekommen.

## 2.7. Diagnose:

Bei Vorliegen von Hautveränderungen kann in der Regel eine klinische Diagnose gestellt werden. Die Lungenform oder die perakute Verlaufsform läßt meist nur eine klinische Verdachtsdiagnose zu. Epidemiologische Fakten können dabei wertvolle Hinweise geben. Gesichert wird die Diagnose durch histopathologische Untersuchungen und durch den Erregernachweis. Giddens et al. (22) weisen jedoch darauf hin, daß intrazytoplasmatische Einschlüßkörperchen in Epithelzellen bei Kanarienvpocken nicht so häufig und eindeutig vorkommen wie die Einschlüßkörperchen bei Hühnerpocken (Bollinger'sche Körperchen), sie können sogar fehlen. Weit häufiger seien eine Hypertrophie und Hyperplasie der Epithelzellen mit sudanophiler Vakuolenbildung im Plasma, die sorgfältig auf eosinophile Einschlüsse zu untersuchen seien, weil deren Eosinophilie erst zu einem späten Zeitpunkt der Infektion auftreten könne.

Der Virusnachweis ist möglich durch Isolierung des Erregers aus Hautveränderungen, Ödemflüssigkeit, Leber etc. und seine Anzüchtung auf der CAM oder in FHE-Kulturen. Eine rasche Schnelldiagnose bietet die direkte elektronenmikroskopische Untersuchung von Ödemflüssigkeit, Organ- und Pockenverreibungen. Serologische Verfahren haben sich in der Praxis noch nicht durchgesetzt.

## 2.8. Therapie:

Eine spezifische Therapie gibt es derzeit noch nicht, wenn auch über eine scheinbar erfolgreiche Chemotherapie berichtet wurde (12). Sicherlich werden dadurch nur bakterielle Sekundärinfektionen beeinflusst.

## 2.9. Prophylaxe:

Versuche, gegen KP zu immunisieren, wurden mit Impfstoffen auf der Basis von heterologem und homologem Virus unternommen.

Wellensiek (71) glaubte, mit Hühnerpockenvirus einen gewissen Schutz gegen eine KPV-Infektion erzielen zu können. Hoekstra und Smit (38) erreichten angeblich eine erfolgreiche Immunisierung mit Putenpockenvirus. Da zwischen dem KPV und den anderen Vogelpockenviren keine Kreuzimmunität besteht, darf die Richtigkeit dieser Angaben heute angezweifelt werden.

Die Versuche von Burnet und Barnard (8) sowie von Kilath und Gollub (43), mit inaktiviertem homologem Virus zu immunisieren, verliefen ebenfalls erfolglos. Erst die Verwendung von aktivem KPV ließ eine immunisierende Wirkung erkennen. Der von Beaudette (4) benutzte, über mehrere Bruteipassagen gewonnene KP-Impfstamm befriedigte bezüglich Unschädlichkeit aber noch nicht. Hartwig und Lange (28) testeten ein aus Hautpocken isoliertes und über 6 Passagen in FHE-Kulturen gezüchtetes KPV. Sie mußten den Stamm jedoch 1000-fach verdünnen, um Impfzwischenfälle zu vermeiden. Einen gut immunisierenden und unschädlichen Impfstoff entwickelte schließlich der Arbeitskreis um Mayr (3, 55). Sie führten einen virulenten KPV-Stamm über Deuerpassagen

in FHE-Kulturen und prüften dabei den Attenuierungsvorgang. Die Unschädlichkeit des auf diese Weise erhaltenen Impfstammes testeten sie durch intrakutane und intramuskuläre Verimpfung an Kanarienvögel, wobei letztere Methode die stärkste Belastungsprobe darstellte. Das Angehen der kutanen Impfung verfolgten die Autoren anhand der Ausbildung von Impfpocken und die immunogene Wirkung überprüften sie durch Testinfektionen mit virulentem Virus. Zu einer vollständigen Attenuierung war es nach der 374. Passage gekommen. Virus dieser Passage war nach intramuskulärer Applikation für Kanarienvögel unschädlich. Dieser Impfstoff, der einen Titer von  $10^{6.2}$  KID<sub>50</sub>/ml bzw. von  $10^{5.7}$  EID<sub>50</sub>/ml hatte, wurde von den Autoren sowohl bei Notimpfungen in verseuchten, als auch für prophylaktische Schutzimpfungen in gesunden Beständen getestet. Als Methode der Impfstoffapplikation wandten sie einen Doppelstich durch die gespannte Flügelhaut mit einer in den Impfstoff eingetauchten, dünnen Kanüle an (Wing-Web-Methode).

In verseuchten Beständen kam die Seuche zum Stillstand, in gesunden wurde ein 100 %-iger Impferfolg erzielt: bei allen Vögeln hatten sich an den Einstichstellen der Flügelhaut deutliche Impfpocken gebildet, deren Abheilung ohne Komplikationen verlief.

Inzwischen ist ein gefriergetrockneter Impfstoff im Handel (Kanapox<sup>R</sup>, Fa. Rentschler-Merieux). Er basiert auf einem durch ca. 400 Dauerpassagen in FHE-Kulturen attenuiertem KPV.

Die prophylaktische Impfung soll stets vor Eintritt der Mauser durchgeführt werden. Nur gesunde, mindestens 3 Monate alte Vögel dürfen geimpft werden. Mit einer dünnen Kanüle wird in den Impf-

stoff eingetaucht und zweimal die ausgestreckte Flügelspannhaut durchstochen. Bei der Nachschau am 10. Tag p.vacc. wird das Angehen der Impfung kontrolliert: Es entwickeln sich an den Stichstellen lokale Impfpocken; ihre Umgebung ist teilweise leicht gerötet und ödematös. Tiere ohne Impfpocken bilden keine Immunität und müssen nachgeimpft werden. Eine Notimpfung in verseuchten Beständen ist möglich. Dabei können die noch nicht erkrankten Vögel vakziniert werden. Hierbei muß wegen des noch nicht voll ausgebildeten Schutzes mit Erkrankungen und Todesfällen bis zu drei Wochen nach der Impfung gerechnet werden. Die Immunität entwickelt sich 5 - 14 Tage nach der Impfung. Sie ist in 2 - 3 Wochen voll ausgebildet und hält in der Regel mindestens 1 Jahr an.

3. Schrifttum: Nicht-parenterale Immunisierungsverfahren gegen Viruserkrankungen in der Tiermedizin:

Immunisierungsverfahren, bei denen das immunisierende Antigen nicht auf parenteralem Wege, sondern über die Schleimhaut des Digestionstraktes oder Respirations- und Genitaltraktes appliziert wird, finden in der Tiermedizin immer größere Verbreitung.

Dabei haben sich besonders attenuierte homologe Virusstämme bewährt. Seuchenhygienische und epidemiologische Bedenken, die sich aus der Anwendung und Verbreitung von attenuierten Virusstämmen ergeben könnten, haben sich bisher in der Praxis nicht bestätigt. Ein Virulentwerden der Impfstämme wurde nicht beobachtet.

3.1. Trinkwasservakzine zur Immunisierung gegen die Atypische Geflügelpest (Newcastle-Disease, ND):

Dieses Impfverfahren brachte die entscheidende Verbesserung der Immunprophylaxe gegen diese gefährliche Krankheit des Nutzgeflügels. Großbestände können nunmehr mit relativ geringem Arbeitsaufwand immunisiert werden. Grundlage des Impfstoffs sind die lentogenen ND-Virusstämme Hitchner B<sub>1</sub> oder La Sota. Wegen ihrer Unschädlichkeit und guten immunogenen Wirkung fanden sie rasch internationale Verbreitung. Dabei hat sich folgendes Impfschema bewährt: Küken ohne maternale Antikörper können im Alter von 3 - 4 Tagen zum ersten Mal über das Trinkwasser immunisiert werden, eine Wiederholungsimpfung ist nach 3 Wochen nötig. Im allgemeinen wird jedoch die 1. Impfung im Alter von 2 - 3 Wochen, die Revakzination im Alter von etwa 8 - 10 Wochen vorgenommen. Der Impfschutz ist nach 10 - 14 Tagen ausgebildet. Er hält mindestens 3 Monate an. Eine dritte Impfung wird für Legetierherden kurz vor dem Legebeginn empfohlen.

(72)

Verschiedene Autoren wiesen allerdings jüngst darauf hin, daß auch die Trinkwasservakzinierung gegen die ND nicht völlig unproblematisch ist. Nach Dorn (15) liegen die Ursachen immer wieder auftretender Versager einmal in technischen Schwierigkeiten und Fehlern: Z.B. können bei Verteilung der Trinkwasservakzine über Nippeltränken Luftblasen bei Unterbrechung der Wasserzufuhr zu ungleicher Impfstoffverteilung führen, und chemische Veränderungen des Trinkwassers (Trinkwasserdesinfektion) einen starken Titerabfall und damit die Unwirksamkeit der Vakzine bedingen. Dorn macht jedoch auch auf immunisatorische Probleme aufmerksam:

Eine hohe Immunität der Elterntierherden beeinflusst eine frühzeitige Erstimmunisierung der jungen Küken negativ, da ihre maternalen Antikörper in den ersten Lebenstagen das Impfvirus abblocken können, so daß es zu keiner aktiven Immunität kommt. Mit einer Sprayvakzination versucht man in jüngster Zeit diese Schwierigkeiten zu umgehen, doch befindet sich das Verfahren noch in der Erprobung. Man geht hierbei von der Vorstellung aus, daß es durch intensive Benetzung der Epithelien im oberen Bereich des Atmungstraktes mit etwa 50 nm großen Impfstofftröpfchen, die zusätzlich auch vom besprühten Federkleid aufgenommen werden, zu einem besonders wirksamen Haften des Virus kommt. Dorn bezeichnet die Verträglichkeit des Verfahrens als gut, wenn nicht zu feine Aerosoltröpfchen in die tiefen Atemwege gelangen.

Karczewski (42) macht für Impfdurchbrüche nach Verwendung des Stammes La Sota Umweltbedingungen (Begleitinfektionen, Haltungsfehler etc.) verantwortlich.

Die Möglichkeit, eine kombinierte Trinkwasservakzine gegen Hühnerpocken und ND anwenden zu können, zeigten Mayr et al. auf.(57)

3.2. Trinkwasservakzine zur Immunisierung gegen die Aviäre Encephalomyelitis (AE):

Im Handel befindliche Oralimpfstoffe gegen die AE basieren auf dem enterotropen, nicht inaktivierten AE-Virusstamm 1143 Calnek. Er wird zur Immunisierung von Zuchttieren im Alter von 10 - 18 Wochen angewendet. Die Impfung erfolgt entweder über das Trinkwasser oder bei 2 - 5 % der Tiere einer Herde mittels Pipette direkt in den Kropf. Da es bei diesen zu einer Virusausscheidung kommt, werden auch die nicht geimpften Tiere durch orale Aufnahme des Virus immun. Die Immunität tritt bei Trinkwasservakzinierung nach etwa 3 - 4 Wochen, bei Einzelimpfung und folgender natürlicher Ausbreitung des Impfvirus im Bestand etwas später ein. Ihre Dauer wird mit etwas länger als eine Legeperiode angegeben. Die Impfung soll 5 Wochen vor Legebeginn oder außerhalb der Legeperioden erfolgen. Es kommt dann zu keiner vertikalen Virusverbreitung über das Ei, sondern die immunen Legehennen vermitteln den Küken eine passive Immunität. Diese schützt die besonders gefährdeten Küken gegen eine Erkrankung nach natürlicher Infektion während der ersten 6 Lebenswochen. (72)

Die Vakzinierung führt nach Dorn (16) bei legenden Herden häufig zu einem starken Leistungsabfall, es kann sogar zu einer anschließenden Mauter kommen.

3.3. Trinkwasservakzine zur Immunisierung gegen die Infektiöse Bronchitis des Geflügels (IB):

Bei Legetierherden ist eine zweimalige Impfung erforderlich, wobei die Erstimpfung im Alter von 3 - 4 Wochen mit einem durch zahlreiche Passagen im embryonierten Hühnerei stark attenuierten Virus (Stamm Massachussetts) durchgeführt wird. Eine Wiederholungsimpfung erfolgt im Alter von 8 - 14 Wochen mit einem weniger stark attenuierten Impfvirus. Dabei muß als Folge der Zweitvakzination mit Impfreaktionen gerechnet werden. Nach Dorn (16) zeigen die praktischen Erfahrungen, daß die geringsten Impfkomplicationen bei Durchführung der Zweitimpfung vor der 10. Lebenswoche auftreten. Impfreaktionen in Form von Atembeschwerden sind ca. 3 - 5 Tage nach Erst- oder Wiederholungsimpfung für die Dauer von 5 Tagen normal. Dauern sie länger, sind sie durch Sekundärinfektionen bedingt. Nach der Vakzination ist mit einer Virusausscheidung zu rechnen; es besteht deshalb eine 30-tägige Verkaufssperre im Anschluß an die Impfung.

Die Dauer der Immunität wird nach der Wiederholungsimpfung mit 1 Jahr angegeben.

In den Vereinigten Staaten wurden verschiedentlich Spray- bzw. Aerosolimmunisierungsversuche mit Erfolg durchgeführt (16). In Deutschland findet dieses Impfverfahren noch keine Anwendung.

Masttiere brauchen nur einmal im Alter von 5 - 14 Tagen vakziniert werden.

3.4. Trinkwasservakzinierung gegen die Infektiöse Bursitis (Gumborokrankheit).

Zum Einsatz kommen mehr oder weniger attenuierte Impfvirusstämme. Die Impfung soll in den ersten Lebenstagen durchgeführt werden. Sie führt zur

Ausbildung einer Immunität, die mindestens für die Lebensperiode, in der es zu klinischen Erscheinungen kommen kann (3. - 8. Woche), ausreicht. Es muß gegenwärtig noch mit einer Komplikationsrate von etwa 5 % gerechnet werden, wenn mit nicht attenuierten Vakzinen geimpft wird. (72)

3.5. Die kloakale bzw. konjunktivale bzw. nasale Impfung gegen die Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT):

Diese Krankheit der Hühner und Fasanen wird mit attenuierten oder schwach virulenten Virusstämmen bekämpft. Die Impfung ist auf verschiedene Weise möglich: Einbringen des Impfvirus in die Kloakenschleimhaut, in Nasen- und Augenschleimhaut. Häufig und mit Erfolg angewandt wird folgendes Impfschema: Die erste Impfung erfolgt kloakal, sie wird durch eine konjunktivale Wiederholungsimpfung nach etwa 4 - 8 Wochen ergänzt.

Eine Impfreaktion in der Kloake ist in Form einer Anschwellung der Schleimhaut nach 4 Tagen feststellbar. Der Eintritt der Immunität beginnt nach etwa 10 Tagen, die Dauer des Impfschutzes wird je nach Impfmodus mit einem halben bis einem Jahr und länger angegeben. Das günstigste Impfalter liegt bei 10 Wochen. (16, 72)

3.6. Aerosol-Vakzinierung zur Bekämpfung der Staupe der Nerze:

Grundlage des Impfstoffes ist ein durch Passagen in Mustexlidenzellkulturen attenuiertes Staupevirus (Stamm Rockborn), das in lyophilisierter Form vorliegt (1). Die Impfvirussuspensionen werden mittels eines Aerosolgeräts vernebelt und von den Nerzen durch Inhalation aufgenommen. Die Tiere werden dazu zweckmäßigerweise in die an den Nerzstä-

figen befindlichen Nest- oder Schutzkästen eingesperrt. Jeder Nerz wird mit einer Aerosoldosis, die bei 1,5 atü in 15 Sekunden erhalten wird, besprays, indem man die Sonde des Verneblers in den Nestkasten oder direkt auf die Nase des Tieres richtet. Sind mehrere Tiere in einem Käfig zusammen untergebracht, muß die Spraydosis auf ein Mehrfaches der Einzeldosis erhöht werden. Dieses Aerosolverfahren bewirkt nach den bisherigen Erfahrungen einen rascheren Schutz bei Staupegefahr als konventionelle Impfmethode, da das Virus die natürlichen Eintrittspforten, insbesondere die Zellen des respiratorischen Epithels, für virulentes Feldvirus blockiert (Interferenzphänomen). Der Impfschutz ist nach etwa 2 Wochen p.vacc. voll ausgebildet. Er soll über mehrere Jahre anhalten. Ein weiterer Vorteil der Methode liegt darin, daß die Immunisierungen ohne Belästigung der Tiere und ohne Zwangsmaßnahmen durchgeführt werden können.

3.7. Intranasale, intravaginale und intrapräputiale Immunisierungsverfahren gegen die Infektiöse bovine Rhinotracheitis/Infektiöse pustuläre Vulvovaginitis (IBR/IPV):

Gegen diese Infektion, die entweder unter dem Bild eines respiratorischen oder unter dem eines genitalen Syndroms ablaufen kann, findet ein Lebendimpfstoff auf der Basis eines in Zellkuren attenuierten Virusstammes Anwendung. Er wird bei Zuchttieren intranasal zweimal im Abstand von 1 - 3 Monaten verabreicht und gewährleistet einen etwa 1 Jahr anhaltenden Impfschutz gegen die respiratorische Verlaufsform. Gegen die genitale Form soll dieser Impfstoff auf die Vaginal- bzw. Präputialschleimhaut appliziert werden. Auch hier wird eine jährliche Wiederholungsimpfung vorgeschlagen. (72)

Dieses Impfverfahren wird z.Zt. erprobt, so daß noch keine abschließende Wertung gegeben werden kann.

3.8. Intranasale Vakzination gegen Parainfluenza-3-Infektionen der Rinder:

Zur Anwendung kommt ein durch Passagen in Kälbernierenzellkulturen attenuiertes Parainfluenza-3-Virus. Es wird Tieren im Alter von 2 Wochen bis 2 Jahren intranasal verabreicht. Dadurch gelangt das Virus an die typischen Manifestationsorgane, kann sich dort ansiedeln und vermehren. Dies führt zu einer aktiven lokalen Gewebsimmunität, ohne eine vorhandene passive, humorale Immunität zu beeinflussen. Durch eine Revakzination im Abstand von 2 - 3 Monaten kommt es dann nicht nur zu einer Verstärkung der örtlichen Gewebsimmunität, sondern es wird auch eine humorale Immunität aufgebaut, die den Tieren einen stärkeren und länger anhaltenden Impfschutz verleiht. (62)

3.9. Prophylaxe der Pferdeinfluenza durch nasale Impfung und Aerosolvakzinierung:

Versuche, mit einer nasalen Applikation von attenuierten Lebendimpfstoffen gegen diese Virusinfektion zu immunisieren, verliefen bis jetzt noch nicht erfolgreich. (72) Auch Aerosolimpfstoffe erwiesen sich als unwirksam.

3.10. Orale Immunisierungsverfahren gegen die Tollwut der Füchse:

Veterinärpolizeiliche Maßnahmen zur Bekämpfung der Wildtollwut konnten die Weiterverbreitung der Seuche in Europa bisher nicht verhindern. Jetzt erhofft man sich durch die orale Immunisierung der Füchse nach Aufnahme präparierter Köder eine

entscheidende Verbesserung der Seuchensituation; das Verfahren befindet sich jedoch noch in der Erprobung.

Die prinzipielle Möglichkeit dieser Methode hatten Correa-Giron et al. (11) mit der oralen Infizierung von Mäusen mit Tollwut-Virus aufgezeigt. Baer und Mitarbeiter (2) immunisierten 1971 erstmals 7 Füchse gegen Tollwut, indem sie eine attenuierte Tollwutvakzine (Stamm ERA) auf Zunge und Backenschleimhaut der Tiere tropften. Alle Tiere bildeten neutralisierende Serum-Antikörper. Sie überlebten eine Testinfektion mit virulentem Straßenvirus 8 Wochen p.vacc.. Die Antikörpertiter der vakzinierten Tiere erreichten 4 Wochen p.vacc. ihren höchsten Wert, um dann wieder leicht abzufallen.

Mayr et al. (59) verwendeten als Impfvirus zur oralen Immunisierung den Plaque-gereinigten Stamm WIRAB, der auf den ERA-Stamm zurückgeht und durch mehrere Passagen in BHK-Zellen weiter attenuiert wurde. Die Autoren immunisierten 2 Tiere über das Trinkwasser und 4 Tiere mittels Pipette direkt auf die Zungen- und Maulschleimhaut. Alle Tiere wurden 2 Monate nach der Erstvakzination oral revakziniert. Dies führte zu einem deutlichen Boostereffekt. Virusneutralisierende Antikörper persistierten im Blut der Impflinge bis zum Versuchsende (39 Wochen p.vacc.). Während des Versuchs geborene Welpen hatten 12 - 24 Stunden post partum einen hohen Titer neutralisierender Antikörper. Anzeichen für eine Schädigung der Impfung traten während der Beobachtungszeit nicht auf.

Debbie und Mitarbeiter (14) immunisierten 40 von 53 Rotfüchsen erfolgreich mit einer im Handel befindlichen Lebendvakzine des Stammes ERA. Versuche, Füchse oral mit einer inaktivierten Vakzine oder anderen handelsüblichen modifizierten Lebendvakzinen zu immunisieren, schlugen fehl.

### 3.11. Orale Immunisierung gegen die Europäische Schweinepest der Wildschweine:

Die im Frühjahr 1973 im süddeutschen Raum aufgetretene Schweinepest beim Schwarzwild versucht man neuerdings durch mit handelsüblichem Schweinepestimpfstoff (Suiferin-C) präpariertes Futter zu bekämpfen. Die mehrmalige Verabreichung des Impfstoffes über das Futter führte im Versuch bei Hauschweinen zu einer befriedigenden Immunität. In

der Praxis scheint sich dieses Verfahren bewährt zu haben: In einem bestimmten Gebiet Bayerns kam die Seuche bei Wildschweinen zum Erliegen. (48)

4. Schrifttum: Orale Immunisierung gegen Pockeninfektionen der Tiere:

4.1. Orale Impfstoffe gegen Hühnerpocken:

Dem Arbeitskreis um Mayr (56, 57, 64) gelang es, Küken mit dem attenuierten Hühnerpockenstamm HP-1 oral zu immunisieren. Die Autoren konnten bei genügend hoher Dosierung eine belastbare Immunität erzielen, die der nach einer kutanen Impfung gleichkam.

Sie applizierten jedem Impfling 0,4 ml der 397. HP-1-Kulturpassage (Titer<sup>7.5</sup> EID<sub>50</sub>/ml), die 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt worden war, mittels Pipette tief intraoesophageal. Eine Revakzination erfolgte 3 Wochen später mit derselben Menge und auf die gleiche Weise. Ferner führten die Autoren Impfversuche über das Trinkwasser durch. Die Impfvirus-Ausgangssuspension wurde 1 : 100 mit Leitungswasser verdünnt und den Tieren in Kunststofftränken (Rinnentränken) vorgesetzt. Die Impfstoffmenge betrug für 60 Tiere 2 l. Bei der 3 Wochen später durchgeführten Revakzination erhielten 45 Tiere ebenfalls 2 l dieser Virus-Trinkwasser-Suspension.

Zum Nachweis einer lokalen Hautimmunität wurden die Impflinge kutan nach der Federfollikelmethode oder zum Nachweis einer zentralen Immunität intravenös mit virulentem Hühnerpockenvirus infiziert.

Von den nicht geimpften Kontrollen erkrankten 100 % der Tiere an generalisierten Hühnerpocken nach intravenöser Testinfektion, nach kutaner Infektion trat eine normale Pustelreaktion auf. Von den intraoesophageal geimpften Tieren zeigten nach i.v. Testinfektion 33 % der Tiere Generalisationerscheinungen; nach kutaner Testinfektion kam es ebenfalls bei 33 % der Impflinge zu einer Pustelreaktion, die jedoch milder verlief und schneller wieder abklang als bei den Kontrolltieren. Von den via Trinkwasser immunisierten Küken erkrankten

nach der i.v. Testinfektion nur 14 % generalisiert an Hühnerpocken, nach kutaner Testinfektion zeigten nur 16 % der Impflinge keine Hautimmunität.

Danner et al. (13) wiesen nach, daß der Impferfolg einer Vakzinierung über das Trinkwasser direkt von der Impfdosis abhängig war.

4.2. Orale Immunisierung von Maus, Kaninchen, Hund, Schwein und Affe mit Vaccinia-Virus gegen eine nachfolgende Vaccinia-bzw. Variola-Infektion:

Hierbei handelt es sich um Modelluntersuchungen, welche die prinzipielle Möglichkeit einer oralen Pockenschutzimpfung des Menschen klären sollten.

Nach Hochstein-Mintzel et al. (35, 36, 37) wird das Vaccinia-Virus bei Mäusen und Kaninchen sowohl bukkal als auch enteral rasch und ohne sich an der Eintrittspforte zu vermehren in den Organismus aufgenommen. Bei Kaninchen traten dabei im unverletzten Magen oder Darm keine spezifischen Veränderungen der Magen-Darmschleimhaut auf, es wurden jedoch vaccinia-spezifische, ulcerative Veränderungen in der Mundhöhle beobachtet, die wahrscheinlich hämatogen entstanden waren. Im respiratorischen Epithel des Respirationstraktes konnten die Autoren dagegen nach bukkaler, enteraler und nasaler Infektion keine Veränderungen finden.

Als wesentliches Ergebnis ihrer oralen Immunisierungsversuche bezeichnen Hochstein-Mintzel u. Mitarbeiter (35, 36, 37) die Unzuverlässigkeit der Wirkung. So konnte bei Mäusen nach einmaliger Gabe von  $10^8$  pockenbildenden Viruseinheiten (CAM) nur ein schlechterer Schutz gegen eine nachfolgende intracerebrale Testinfektion mit Vaccinia-Virus induziert werden als nach parenteraler Gabe von  $10^4$  Viruseinheiten. Steigende Immunisierungsdosen oder mehrfache Applikationen ließen zwar die Zahl der überlebenden Versuchstiere ansteigen, eine genaue Dosis oder Applikationshäufigkeit zur Erzielung eines zuverlässigen Infektionsschutzes konnten sie jedoch nicht angeben.

Beim Kaninchen erzielten die Autoren bessere Ergebnisse. Hier unterdrückten  $10^5$  Viruseinheiten, 5 x oral verabreicht, eine kutane Testinfektion mit Vaccinia-Virus.

völlig. Dabei zeigte sich auch, daß es in der Regel bei den geschützten Tieren zu der Ausbildung von hämagglutinationshemmenden Antikörpern gekommen war. Die nasale Applikation von Vaccinia-Virus war jedoch von einem wesentlich besseren Immunisierungseffekt gefolgt. Beim Kaninchen unterdrückten  $10^5$  Viruseinheiten schon bei zweimaliger Gabe im Gegensatz zur oralen Immunisierung die kutane Impfreaktion völlig. Der bessere Immunisierungseffekt äußerte sich auch in hohen hämagglutinationshemmenden Antikörper-Titern. Eine besser immunisierende Wirkung zeigte dieses Verfahren auch bei Mäusen.

Die bei Hund und Schwein erzielten Ergebnisse haben nach den Angaben der Autoren nur bedingten Aussagewert. Anscheinend waren hochdosierte orale Immunisierungen erfolgreich.

Bei Affen (*Makaka irus*) bewirkte eine intragastrale Applikation von 50 ml einer Vaccinia-Virususpension, die  $3,5 \times 10^8$  Viruseinheiten enthielt, einen völligen Schutz gegen eine subkutane Testinfektion mit Variola-Virus ( $2 \times 10^7$  VE). Die Immunität war auch serologisch nachweisbar.

Huber und Mitarbeiter (39) kamen bei gleicher Methodik zum selben Ergebnis. Die Verabreichung des Impfstoffes über magensaftresistente Kapseln und in Tablettenform war dagegen weniger immunogen wirksam.

#### 4.3. Orale Immunisierung gegen Mäusepocken:

Munz et al. (61) prüften die Wirksamkeit einer oralen Immunisierung gegen Mäusepocken (Verabreichung der Impfstoffe über das Trinkwasser und mittels einer Sonde) im Vergleich zur intraperitonealen Impfstoffapplikation unter Verwendung eines attenuierten und eines nicht attenuierten Vaccinia-Virus-Stammes. Die erzielte Immunität wurde durch

den Nachweis hämagglutinationshemmender Antikörper (hah-AK) und durch Testinfektion mit virulentem Ektromelievirus geprüft. Die Autoren stellten fest, daß eine orale Immunisierung von Mäusen mit Vaccinia-Virus gegen Mäusepocken prinzipiell möglich ist, doch ließ sich eine belastbare Immunität nur dann erzielen, wenn wenigstens 3 x  $10^{6.75} \text{KID}_{50}$  in 3 - 7 tägigem Abstand dreimal mit einer Sonde appliziert wurden. Unterschiede in der Immunogenität der Impfstoffe traten nicht auf. Nur eine sehr unbefriedigende Immunität war durch eine dreimalige freiwillige Aufnahme der Impfstoffe als Tränke ( $10^{7.5} - 10^{8.5} \text{KID}_{50}$ ) zu erzielen. Alle intraperitoneal immunisierten Tiergruppen erwiesen sich dagegen als sicher geschützt. Bei allen Immunisierungsverfahren zeigte es sich, daß die Tiere, bei denen es zur Ausbildung von hah-AK gekommen war, in der Regel auch gegen die Testinfektion geschützt waren. Demnach bietet eine perorale Immunisierung gegen Mäusepocken noch keine Vorteile gegenüber der derzeit üblichen intraperitonealen Immunisierung.

5. Eigene Untersuchungen:

5.1. Material und Methoden:

5.1.1. Abkürzungen:

|                      |   |                                                                             |
|----------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------|
| FHE-Kulturen         | = | Kulturen aus Hühnerembryo-Fibroblasten                                      |
| PBS                  | = | Phosphat-gepufferte Salzlösung                                              |
| PBST                 | = | Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,25 % Trypsin                           |
| RAF                  | = | Rinder-Amnion-Flüssigkeit                                                   |
| KP 1 att.            | = | über FHE-Kulturpassagen attenuiertes Kanarienvpocken-Virus, Stamm KP 1      |
| Kanapox <sup>R</sup> | = | Kanarienvpockenimpfstoff der Fa. Rentschler-Merieux                         |
| KP 1 vir.            | = | virulentes Kanarienvpocken-Virus, Stamm KP 1                                |
| KP                   | = | Kanarienvpocken                                                             |
| KPV                  | = | Kanarienvpockenvirus                                                        |
| zpE                  | = | Zytopathischer Effekt                                                       |
| KID <sub>50</sub>    | = | Virusdosis, die bei 50 % der inokulierten Zellkulturen einen zpE hervorruft |
| LD <sub>50</sub>     | = | Virusdosis, die 50 % der inokulierten Versuchstiere tötet.                  |
| CAM                  | = | Chorio-Allantois-Membran                                                    |
| PWS                  | = | Phosphor-Wolfram-Säure                                                      |

5.1.2. Zellkulturen:

Zur Virusanzüchtung und -vermehrung sowie für die Titrationen wurden ausschließlich FHE-Kulturen verwendet. Wir lehnten uns bei ihrer Herstellung an die von Dulbecco (17) beschriebene Technik an.

Zehn Tage bei 37°C bebrütete Hühnereier werden embryoniert und die Augen und Extremitäten der Embryonen entfernt. Sie werden dann durch eine 50-ml-Recordspritze mit Veterinärkonus in einen Erlen-

meyer-Kolben gepreßt und mit PBS bis zur Klarheit des Überstandes gewaschen. Der aus Zelldetritus und Erythrozyten bestehende Überstand wird dabei verworfen. Nach Vortrypsinierung mit PBST über 10 Minuten versetzen wir das sedimentierte Gewebe wieder mit PBST im Verhältnis 1 : 20 und trypsinieren es 2 Stunden auf dem Magnetrührer bei 37°C im Brutschrank. Nach Filtration der Zellsuspension durch einen vierfachen Gazefilter und Zentrifugation (20 Minuten bei 250 x g) wird das Sediment in Lactalbumin-Yeast-Medium mit 10 % Kälberserum aufgenommen und die Zellzahl auf 500 000 / ml eingestellt.

Wir füllen in Vierkantkolben 20 ml und in Roux-Schalen 100 ml Zellsuspension ein.

Diese Kulturen dienten zur Virusvermehrung, während die Titrationen in Leighton-Röhrchen (Fa. Bellco-Glass) vorgenommen wurden, die mit 2 ml Zellsuspension beschickt waren.

Nach 3 - 4 Tagen hatte sich in der Regel ein dichter Zellrasen ausgebildet. Als Erhaltungsmedium diente RAF. Allen Medien waren Penicillin und Streptomycin in üblicher Dosierung zugesetzt.

### 5.1.3. Virusstämme:

#### 5.1.3.1. Virusstämme zur Immunisierung:

Ausgangsmaterial zur Impfstoffherstellung war

a) der Kanarienspockenvirus-Stamm KP 1 att..

Er lag als Kulturvirus der 535. FHE-Passage vor. \*\*

b) der Stamm Kanapox<sup>R</sup> in der 400. FHE-Passage.

#### 5.1.3.2. Virusstamm zur Testinfektion:

Dazu benutzten wir den eiadaptierten Stamm KP 1 vir.. Er war uns als lyophilisierte 6. Eipassage überlassen worden. \*\*

\*\* Für die Überlassung der Impfstämme KP 1 att. und KP 1 vir. sind wir Herrn Prof. Dr. A. Mayr (Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Tierärztl. Fakultät der Universität München) zu Dank verpflichtet.

#### 5.1.4. Viruszüchtung:

Die Anzüchtung des Stammes KP 1 att. erfolgte zuerst in Vierkantkolben. Sie wurden mit 1 ml Virussuspension der 535. FHE-Passage und 9 ml RAF beschickt. Nach einer Adsorptionszeit von 3 Stunden bei 37°C wurde nicht adsorbiertes Virus durch Waschen mit PBS entfernt und anschließend 20 ml RAF als Erhaltungsmedium zugegeben. Der zpE entsprach den Angaben in der Literatur. Er war gekennzeichnet durch eine ab dem dritten Tag p.i. auftretende starke Granulierung der Zellen, die schließlich in eine deutliche Quellung überging und ab dem 6. Tag p.i. zur Lysis führte. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Virusernte durch Einfrieren und Wiederauftauen der Kulturen. Um noch zellgebundenes Virus freizusetzen, wurden die Passagen mit einem Homogenisator (Ultraturrax der Fa. Janke u. Kunkel) im Eisbad behandelt und dann die Suspension kurz bei 2200 x g abzentrifugiert. Der titrierte Überstand diente als Ausgangsmaterial zur Impfstoffherstellung.

Dazu beimpften wir FHE-Kulturen in Roux-Schalen im Verhältnis 1 : 5 (Virussuspension zu RAF). Die Aufarbeitung der infizierten Kulturen entsprach dem obigen Schema. Es wurden 15 Passagen in FHE-Kulturen (536. - 550-FHE-Passage) durchgeführt.

Der Stamm Kanapox<sup>R</sup> wurde auf dieselbe Weise angezüchtet und in 6 Passagen vermehrt. Der gleichgeartete zpE trat bei diesem Stamm in der Regel etwa 1 Tag später auf als beim Stamm KP 1 att..

Der zur Testinfektion dienende Stamm KP 1 vir. wurde ebenfalls in Vierkantkolben gezüchtet. Nach 2 Passagen in FHE-Kulturen stand genügend Infektionsvirus zur Verfügung. Bis zu seiner Verwendung wurde es in Kleinportionen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Auffallend war, daß der zpE dieses Stammes bereits 2 Tage p.i. auftrat. Er war anfangs gekennzeichnet durch in Zentren auftretende gequollene und stark granulierte Zellen. Ab dem 4. Tag p.i. kam es zur Lysis der Zellen und teilweisen Ablösung des Zellrasens. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Passagen beendet.

#### 5.1.5. Titrierungen:

Der Virusgehalt der Impfstoffe und des "Challenge"-Virus wurde auf FHE-Kulturen in Leighton-Röhrchen bestimmt: Ansatz der Verdünnungen in 10-er Potenzen, Beimpfung von je 4 Röhrchen pro Verdünnungsstufe mit 1 ml Virusverdünnung + 1 ml RAF pro Röhrchen. Der zpE wurde täglich bis zur Endablesung kontrolliert, die meist um den 9. Tag p.i. möglich war.

Zur Bestimmung der  $\text{LD}_{50}$  des Testvirus infizierten wir 28 Kanarienvögel mit jeweils 0,1 ml der Verdünnungen  $10^{-1}$  -  $10^{-7}$  des Stammes KP 1 vir. intramuskulär in den Brustmuskel, wobei wir jeweils 4 Vögel pro Verdünnungsstufe verwandten. Die Berechnung der  $\text{KID}_{50}$  bzw.  $\text{LD}_{50}$ -Werte erfolgte nach Kärber (41).

#### 5.1.6. Virustiter:

Die zur Immunisierung und Testinfektion verwendeten Viruspassagen hatten folgende Titer:

a) Stamm KP 1 att.:

|                                           |   |                                    |
|-------------------------------------------|---|------------------------------------|
| 540. FHE-Passage                          | = | $10^{6.25}$ KID <sub>50</sub> / ml |
| 541. FHE-Passage                          | = | $10^{5.75}$ KID <sub>50</sub> / ml |
| 545. FHE-Passage                          | = | $10^{6.25}$ KID <sub>50</sub> / ml |
| 550. FHE-Passage                          | = | $10^{6.5}$ KID <sub>50</sub> / ml  |
| vereinigte<br>547. - 549.<br>FHE-Passagen | = | $10^{6.0}$ KID <sub>50</sub> / ml  |

b) Stamm Kanapox<sup>R</sup>:

|                                           |   |                                    |
|-------------------------------------------|---|------------------------------------|
| 400. FHE-Passage                          | = | $10^{5.0}$ KID <sub>50</sub> / ml  |
| 402. FHE-Passage                          | = | $10^{5.75}$ KID <sub>50</sub> / ml |
| vereinigte<br>402. - 404.<br>FHE-Passagen | = | $10^{5.0}$ KID <sub>50</sub> / ml  |

c) Stamm KP 1 vir.:

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| = | $10^{5.75}$ KID <sub>50</sub> / ml |
| ≡ | $10^{7.0}$ LD <sub>50</sub> / ml   |

5.1.7. Prüfung der Impfstoffe auf Thermoresistenz:

Da der Erfolg einer Trinkwasservakzinierung weitgehend vom Gehalt des Impfstoffes an aktivem Virus abhängig ist, prüften wir den Titerabfall der Impfstoffe nach 24 - 48-stündiger Lagerung bei Zimmertemperatur (22°C). Innerhalb von 24 Stunden war praktisch kein, nach 48 Stunden nur ein geringer Titerabfall (0,5 lg) festzustellen.

5.1.8. Virusrückisolierung:

Zur Sicherung der Diagnose wurden von infizierten und gestorbenen Tieren Leber und Lunge bei -20°C eingefroren, anschließend verrieben und davon Verdünnungsstufen auf die CAM 10 Tage bebrüteter Hühnereier verimpft. 5 Tage später erfolgte die Untersuchung der Membranen auf spezifische Veränderungen.

5.1.9. Elektronenoptische diagnostische Untersuchungen: \*

Dazu wurden entsprechend präparierte Schnitte aus Leber und Lunge von infizierten Tieren, aber auch Ödemflüssigkeit der Brustmuskulatur nach Negativkontrastierung mit PWS im Elektronenmikroskop auf das Vorhandensein von Pockenviren untersucht.

5.1.10. Versuchstiere:

Als Versuchstiere dienten von süddeutschen Züchtern aufgekaufte, in der Regel etwa 9 Monate alte, nicht gegen Kanarienvogelpocken geimpfte, männliche und weibliche Kanarienvögel. Für jede Versuchsreihe stand jeweils ein Kollektiv von einem Züchter zur Verfügung. Die Tiere kamen zuerst mindestens 3 Wochen in selbstgebaute Volieren oder Drahtgitterkäfige zur Beobachtung.

Wir fütterten sie mit handelsüblichem Kanarienvogelmischfutter, Salat und Apfelstücken. Das Trinkwasser wurde in Plastiktränken angeboten. Präparierter Vogelsand stand den Tieren in genügender Menge zur Verfügung, auch hatten sie ausreichend Gelegenheit zum Baden. Immunisierte Tiere und nicht geimpfte Kontrollen wurden bis zum Belastungsversuch räumlich getrennt gehalten.

Die Beschaffung der Versuchstiere war außerordentlich schwierig, weil nur zu bestimmten Jahreszeiten (November bis April) größere Tiergruppen bezogen werden konnten. Dieser Umstand sowie der hohe Preis pro Tier bedingten die Aufspaltung in jeweils kleine und uneinheitlich große Versuchsgruppen (vgl. Tabellen 3 - 6). Erschwerend fiel ferner ins Gewicht, daß bei einigen Sendungen vor Versuchsbeginn größere Ausfälle infolge Erkältungskrankheiten und Parasitenbefall (*Dermanyssus* gal-

\* Für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen danken wir Herrn Dr. E. Göbel (Institut für Vergl. Tropenmedizin der Tierärztl. Fakultät der Universität München),

linae und Coccidien) auftraten. Die Parasitosen konnten erfolgreich mit Rabond<sup>R</sup> (Fa. Shell-Chemie) und Amprovet<sup>R</sup> (Fa. Merck, Sharp u. Dohme) bekämpft bzw. behandelt werden. In die Versuche kamen nur klinisch unauffällige Tiere (insgesamt 402). Die Infektionsversuche führten wir in einem Isolierstall mit Schleuseneinrichtung für Mensch und Material durch.

#### 5.1.11. Impfmethoden:

##### 5.1.11.1. Intraoesophageale Applikation:

Für diese Methode verwendeten wir eine Tuberkulinspritze mit aufgesetztem Plastikirrigator (Innendurchmesser 0,2 mm), der etwa 2 - 3 cm in den Oesophagus eingeführt wurde. Jedes Tier erhielt jeweils 1,0 ml Impfstoff; diese Menge konnte ohne Schwierigkeiten verabfolgt werden. Das Einführen des Irrigators gelang leicht bei gestrecktem Hals der Vögel, wobei es nicht zu Verletzungen kam.

##### 5.1.11.2. Intrakloakale Impfstoffapplikation:

Der Konus einer Tuberkulinspritze wurde in die Kloake der Vögel eingeführt und bis zu 0,2 ml Impfstoff appliziert. Diese Menge wurde in der Regel dann nicht wieder ausgepreßt, wenn man nach der Impfstoffapplikation die Tiere in Rückenlage noch eine gewisse Zeit in der Hand hielt. Bei manchen Tieren war jedoch ein teilweises Auspressen nicht ganz zu vermeiden.

##### 5.1.11.3. Vakzinierung über das Trinkwasser:

Die Vögel erhielten die Impfstoffe unverdünnt als Tränke in Plastikgefäßen zur freien Aufnahme vorgesetzt. Diese gestatteten nur eine orale Aufnahme. In der Regel waren die angebotenen Volumina

schon nach spätestens 5 Stunden getrunken. Die jeweiligen Impfstoffmengen sind bei der Beschreibung der Versuche angegeben.

#### 5.1.11.4. Spray-Vakzinierung:

Zur Vernebelung der Impfstoffe verwendeten wir das Sauerstoff-Aerosolgerät Oxyparat<sup>R</sup> (Fa. Allihn u. Co.). Der Vernebler erzeugt bei 1,5 atü Tröpfchen von 0,5-5  $\mu$  Durchmesser. Die Tiere wurden gruppenweise in ein Durchflußrohr aus Glas gesetzt, um sie während der Vakzinierung beobachten zu können. Die Sonde des Verneblers führte durch einen Gummistopfen in das Rohr. Die Dauer der Impfstoffvernebelung betrug 10 bzw. 20 Minuten, je nachdem, ob 3 oder 6 ml Impfstoff versprüht wurden. Die Tiere inhalieren dabei Impfvirus und Sauerstoff. Da auch das Gefieder durch feinste Impfstofftröpfchen benetzt wird, nehmen die Tiere einen Teil des Impfstoffs später auch noch beim Putzen auf. Angaben darüber, wieviel Impfstoff bei der Spray-Vakzination tatsächlich zur Aufnahme gelangt, können nicht gemacht werden.

#### 5.1.11.5. Nasale Impfstoffapplikation:

Zur nasalen Immunisierung verwendeten wir eine Tuberkulinspritze mit aufgesetzter Kanüle (Größe 20). Bei strenger Fixierung des Kopfes wurde diese in eine Nasenöffnung eingeführt und dann 0,05 ml Impfstoff appliziert. Diese Menge nahmen die Tiere ohne Schwierigkeiten auf.

#### 5.1.11.6. Applikation der Impfstoffe in die Federfollikel (kutane Vakzinierung):

An einem Oberschenkel wurden mindestens 30 Federn entfernt und 0,05 ml Impfstoff in die Follikel mit einer Impflanzette intensiv eingerieben. Wir

beobachteten die Vögel 14 Tage lang auf das Auftreten von Impfreaktionen (Follikelschwellungen oder lokale Impfpocken).

5.1.11.7. Intrakutane Impfung nach der Wing-Web-Methode:

Eine im Impfstoff eingetauchte dünne Kanüle wird zwei Mal durch die gespannte Flügelhaut der Versuchstiere gestochen. Wir überprüften alle Tiere 14 Tage lang auf das Auftreten von Impfreaktionen. Diese äußerten sich als lokale Impfpocken mit Rötung und Schwellungen um die Stichstellen.

5.1.11.8. Intramuskuläre Vakzinierung in die Brustmuskulatur:

Mit einer Tuberkulinspritze (Kanüle: Größe 20) wurden jeweils 0,1 ml Impfstoff parasternal injiziert. Die Beobachtungszeit betrug ebenfalls 14 Tage.

5.1.12. Unschädlichkeitsprüfung der Impfstoffe:

Die Stämme KP 1 att. (540. FHE-Passage) und Kanapox<sup>R</sup> (402. FHE-Passage) wurden in Vorversuchen an jeweils 5 Versuchstiere pro Applikationsmodus zur Prüfung der Unschädlichkeit verimpft. Die Dosis für die intraoesophageale Immunisierung betrug 1,0 ml, für die kloakale Applikation 0,2 ml, für die nasale Impfung 0,05 ml. Bei der Aerosolvakzination vernebelten wir 6 ml, als Tränke setzten wir den Vögeln 20 ml Virussuspension unverdünnt vor. Intramuskulär verimpften wir jeweils 0,1 ml. Bei der Federfollikel-Methode wurden 0,05 ml Impfstoff intensiv eingerieben. Bei der Wing-Web-Methode stachen wir eine in Impfstoff eingetauchte Kanüle 2 mal durch die gespannte Flügelhaut.

Die Beobachtungszeit betrug 14 Tage. Danach wurden die Tiere getötet und auf pathologisch-anatomische Veränderungen untersucht. Kamen während

der Beobachtungszeit Tiere ad exitum, so verimpften wir zusätzlich Lungen- und Leberverreibungen auf die CAM 10 Tage embryonierter Hühnereier.

5.1.13. Testinfektionen mit virulentem Virus:

Sie dienten dem Zweck, die durch die verschiedenen Impfmethoden erzeugte Immunität nachzuweisen. Jeweils 2 bzw. 3 Wochen nach der letzten Vakzinierung wurden die Vögel mit  $10^{3.25}$  LD<sub>50</sub> des Stammes KP 1 vir. intramuskulär in die Brustmuskulatur infiziert. Die Bestimmung der LD<sub>50</sub> (vgl. 5.1.5.) hatte ergeben, daß auf diese Weise bei nicht immunen Tieren mit Sicherheit eine tödliche Infektion gesetzt werden konnte. Der Verlauf der Testinfektion wurde 28 Tage lang kontrolliert. Bei jedem Belastungsversuch liefen eine ausreichende Anzahl voll empfänglicher Tiere als Kontrollen parallel. Insgesamt setzten wir dafür 50 Vögel ein.

5.1.14. Bakteriologische Prüfung:

Alle Viruspräparationen wurden vor ihrer Anwendung bakteriologisch untersucht. Verunreinigungen waren nicht nachweisbar.

5.1.15. Impfplan und Methoden der nicht parenteralen Immunisierung und Zeitpunkt der Testinfektion:

Die relevanten Daten für die Versuchsdurchführung sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3:

Impfplan und Methoden der nicht-parenteralen Immunisierung und Zeitpunkt der Testinfektion

| Gen. -<br>Kurz-<br>N. | Art des Impfstoffes, Titer in KID <sub>50</sub> /ml | Art der Impfstoffapplikation | verabreichte Impfstoffdosis in ml | Anzahl/Abstand der Vakzinationen | Anzahl der Versuchstiere | Zeitpunkt d. Testinfektion n. d. letzten Vakzination |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------|
| 1                     | 540. FHE KP 1 att. 106.25                           | intraoesophageal             | 1,0/Tier                          | 2/3 Tage                         | 7                        | 14                                                   |
| 2                     | 548. FHE KP 1 att. 106.25                           | intraoesophageal             | 1,0/Tier                          | 2/3 Tage                         | 23                       | 14                                                   |
| 3                     | 547. FHE KP 1 att. 106.25                           | kloakal                      | 0,2/Tier                          | 2/3 Tage                         | 6                        | 14                                                   |
| 4                     | 549. FHE KP 1 att. 106.25                           | kloakal                      | 0,2/Tier                          | 2/3 Tage                         | 45                       | 14                                                   |
|                       | 402. FHE Kanapox <sup>R</sup> 105.75                | kloakal                      | 0,2/Tier                          | 5/1 Tag                          | 4                        | 14                                                   |
|                       | 402. FHE Kanapox <sup>R</sup> 105.75                | nasal                        | 0,05/Tier                         | 2/3 Tage                         | 4                        | 14                                                   |
|                       | 546. FHE KP 1 att. 106.25                           | Trinkwasser                  | 20/3 Tiere                        | 2/3 Tage                         | 8                        | 14                                                   |
|                       | 548. FHE KP 1 att. 106.25                           | Trinkwasser                  | 30/15 Tiere                       | 2/3 Tage                         | 15                       | 14                                                   |
|                       | 547. FHE KP 1 att. 105.75                           | Trinkwasser                  | 30/15 Tiere                       | 5/1 Tag                          | 15                       | 14                                                   |
|                       | Gen. FHE KP 1 att. 106.5                            | Trinkwasser                  | 10/10 Tiere                       | 5/1 Tag                          | 10                       | 14                                                   |
|                       | Gen. FHE KP 1 att. 106.5                            | Trinkwasser                  | 10/10 Tiere                       | 10/1 Tag                         | 10                       | 14                                                   |
| 2                     | 402. FHE Kanapox <sup>R</sup> 105.75                | Trinkwasser                  | 20/3 Tiere                        | 5/1 Tag                          | 3                        | 14                                                   |
| 3                     | Gen. FHE Kanapox <sup>R</sup> 105.75                | Trinkwasser                  | 10/10 Tiere                       | 5/1 Tag                          | 10                       | 14                                                   |
| 4                     | Gen. FHE Kanapox <sup>R</sup> 105.75                | Trinkwasser                  | 10/10 Tiere                       | 10/1 Tag                         | 10                       | 14                                                   |
| 5                     | 547. FHE KP 1 att. 106.25                           | Aerosol                      | 3/3 Tiere                         | 2/3 Tage                         | 10                       | 14                                                   |
| 6                     | 549. FHE KP 1 att. 106.5                            | Aerosol                      | 6/3 Tiere                         | 2/3 Tage                         | 3                        | 21                                                   |
| 7                     | 547. FHE KP 1 att. 106.5                            | Aerosol                      | 3/7 Tiere                         | 5/1 Tag                          | 6                        | 21                                                   |
|                       | 402. FHE Kanapox <sup>R</sup> 105.75                | Aerosol                      | 3/7 Tiere                         | 5/1 Tag                          | 7                        | 21                                                   |
| 9                     | 402. FHE Kanapox <sup>R</sup> 105.75                | Aerosol                      | 6/4 Tiere                         | 2/3 Tage                         | 4                        | 21                                                   |

Gen.FHE KP 1 att. = vereinigte 547. - 549. FHE-Passagen des Stammes KP 1 att.

Gen.FHE Kanapox<sup>R</sup> = vereinigte 402. und 404. FHE-Passagen des Stammes Kanapox

5.1.16. Impfplan und Methoden der parenteralen Immunisierung und Zeitpunkt der Testinfektion:

Die Einzelheiten der Versuchsanordnung sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4:

Impfplan und Methoden der parenteralen Immunisierung und Zeitpunkt der Testinfektion:

| Versuch<br>Nr. | Art des Impfstoffes und<br>Titer in<br>KID <sub>50</sub> /ml | Art der<br>Impfstoff-<br>applika-<br>tion | verabreichte<br>Impfstoffdo-<br>sis | Anzahl<br>der Vak-<br>zinatio-<br>nen | Anzahl<br>der<br>Ver-<br>suchs-<br>tiere | Zeitpunkt<br>d. Testi-<br>fektion<br>d. letzten<br>Vakzinat |
|----------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 20             | 545. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>6.25</sup>                     | kutan<br>Feder-<br>follikel               | 0,05 ml/Tier                        | 1                                     | 8                                        | 14                                                          |
| 21             | 545. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>6.25</sup>                     | intra-<br>kutan<br>Wing-Web               | Kanüle mit<br>Impfstoff<br>benetzt  | 1<br>z.T.nach-<br>vakzi-<br>niert     | 9                                        | 14                                                          |
| 22             | 400. FHE Kana-<br>pomp <sup>1</sup> 10 <sup>5.75</sup>       | intra-<br>kutan<br>Wing-Web               | Kanüle mit<br>Impfstoff<br>benetzt  | 1                                     | 8                                        | 14                                                          |
| 23             | 545. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>6.25</sup>                     | intramus-<br>kulär                        | 0,1 ml/Tier                         | 1                                     | 8                                        | 14                                                          |

5.2. Versuche und Ergebnisse:

5.2.1. Ergebnisse der Unschädlichkeitsprüfungen der verwendeten Impfstoffe:

Die Stämme KP 1 att. und Kanapox<sup>R</sup> ließen nach intraoesophagealer, kloakaler und nasaler Verabreichung und bei Applikation als Trinkwasser- und Aerosolvakzine keinerlei Schadwirkungen erkennen. Der Stamm KP 1 att. rief bei kutaner (Federfollikel-Methode) und intramuskulärer Verimpfung keine, nach intrakutaner Anwendung (Wing-Web-Methode) nur undeutliche Impfreaktionen hervor. Der Stamm Kanapox<sup>R</sup> verursachte nach der Federfollikel-Methode keine Reaktion, nach der Wing-Web-Methode deutliche lokale Impfpocken (6. - 10. Tag p.vacc.), die sich als etwa 2 - 3 mm große Impfpusteln an den Stichstellen äußerten, die innerhalb von 3 - 4 Tagen eintrockneten. Das Allgemeinbefinden der Tiere war dabei nicht gestört. Die intramuskuläre Verimpfung dieses Stammes wurde nur von 2 der 5 Tiere schadlos vertragen. Die anderen 3 Vögel starben an einer generalisierten Infektion. Sie äußerte sich pathologisch-anatomisch im Auftreten typischer ödematöser Veränderungen der Brustmuskulatur; Leber- und Lungenverreibungen der verendeten Tiere riefen auf der CAM KPV-spezifische Herde hervor. Wir haben deshalb diesen Impfmodus beim Stamm Kanapox<sup>R</sup> nicht in die Vergleichsuntersuchungen aufgenommen.

5.2.2. Verlauf und Ergebnisse der Testinfektionen nach nicht-parenteralen Immunisierungen:

Die Versuche, Kanarienvögel durch Applikation der Impfstoffe in die Kloake, über das Trinkwasser und mittels Sprayverfahren (Aerosol) zu immunisieren, wurden mit zwei verschiedenen Impfstoffstämmen durchgeführt: Zum einen mit Virusmaterial der

540. - 550. FHE-Passage des Stammes KP 1 att. mit Titern von  $10^{5.75}$  -  $10^{6.5}$  KID<sub>50</sub>/ml, zum anderen mit Virusmaterial der 402. und einem Gemisch aus 402. und 404. FHE-Passage des Stammes Kanapox<sup>R</sup> mit Titern von  $10^{5.75}$  bzw.  $10^{5.0}$  KID<sub>50</sub>/ml. Zu den intraoesophagealen Immunisierungsversuchen wurde nur der Stamm KP 1 att., zur nasalen Immunisierung nur der Stamm Kanapox<sup>R</sup> verwendet (Vergleiche Tabelle 3).

Weitere Unterschiede ergaben sich einmal aus der Anzahl der Vakzinierungen, die zwischen einer einmaligen Wiederholungsimpfung 8 Tage nach der Erstvakzination und einer zehnmaligen Impfstoffgabe schwankte, zum andern aus der jeweils verabfolgten Impfstoffdosis. Genaue Angaben über die tatsächlich aufgenommene Impfvirusmenge bei der Sprayvakzination sind jedoch nicht möglich.

Mit den einzelnen unterschiedlichen Immunisierungsmethoden wurden folgende Ergebnisse erzielt: (Vergleiche Tabelle 5).

#### 5.2.2.1. Intraoesophageale Immunisierung mit dem Stamm KP 1 att.:

Von 7 mit der 540. FHE-Passage dieses Stammes zweimal im Abstand von 8 Tagen immunisierten Vögeln überlebten 6 die Testinfektion. Mit der 545. FHE-Passage dieses Stammes immunisierten wir 23 Tiere, von denen nur 6 den Belastungsversuch überstanden. Der einzige Unterschied in der Versuchsanordnung bestand in der Passagezahl der Impfstoffe. (Versuche Nr. 1 u. 2)

5.2.2.2. Kloakale Immunisierung mit den Stämmen KP 1 att. und Kanapox<sup>R</sup>:

Nach zweimaliger Immunisierung im Abstand von 8 Tagen mit der 540. FHE-Passage des Stammes KP 1 att. waren von 6 Vögeln 3 immun; nach Impfung mit seiner 545. FHE-Passage erwiesen sich von 45 Tieren nur 12 gegen die Testinfektion geschützt. Auch hier lag der einzige Unterschied in der Passagenzahl.

Mit der 402. FHE-Passage des Stammes Kanapox<sup>R</sup> wurden 4 Tiere fünfmal an aufeinanderfolgenden Tagen immunisiert. Hier überlebten 3 der 4 Tiere die Testinfektion. (Vers. Nr. 3 - 5)

5.2.2.3. Nasale Immunisierung mit dem Stamm Kanapox<sup>R</sup>:

Von 4 innerhalb von 8 Tagen zweimal immunisierten Tieren starben 2 nach der Testinfektion, wobei allerdings nur bei einem Tier die typischen Anzeichen der Lungenform bestanden. Der andere Vogel starb unter unspezifischen Krankheitserscheinungen. (Vers. Nr. 6)

5.2.2.4 Immunisierung über das Trinkwasser:

Mit der 540. FHE-Passage und der 545. FHE-Passage des Stammes KP 1 att. wurden Kanarienvögel zweimal im Abstand von 8 Tagen immunisiert. Von der 540. Passage erhielten 8 Tiere 20 ml, von der 545. Passage 15 Vögel 30 ml unverdünnte Virussuspension als Tränke angeboten. Der Impferfolg unterschied sich nicht wesentlich. Etwa ein Viertel der Impflinge überlebte die Testinfektion. (Vers. Nr. 7 und 8)

Durch Erhöhung der Impfstoffdosis wie auch durch vermehrte Revakzinationen versuchten wir nochmals ein besseres Ergebnis zu erzielen. Deshalb erhielt-

ten 15 Tiere fünfmal an aufeinanderfolgenden Tagen die 541. Passage des Stammes KP 1 att., wobei jedesmal 30 ml den Tieren verabreicht wurden (Versuch Nr. 9).

Im Versuch Nr. 10 wurde ein Gemisch der 547. - 549. FHE-Passagendieses Stammes in der doppelten Menge bei gleicher Anzahl der Vakzinationen angeboten. Bei beiden Versuchen war nur ein sehr schwacher Immunisierungserfolg nachweisbar: In Versuch Nr. 9 überlebten 2 von 15 Tieren, in Versuch Nr. 10 nur 1 der 10 immunisierten Vögel. In Versuch Nr. 11 verdoppelten wir noch zusätzlich die Anzahl der Revakzinationen. Dies führte zu einem wesentlich besseren Impferfolg. Es widerstanden 6 von 10 Tieren der Testinfektion.

Gleichartige Versuche (Versuche Nr. 12 - 14) wurden unter Verwendung der 402. FHE-Passage und einem Gemisch aus der 402. und 404. FHE-Passage des Stammes Kanapox<sup>R</sup> durchgeführt. Im Versuch Nr. 12 erhielten 8 Tiere 20 ml Impfstoff unverdünnt an 5 aufeinanderfolgenden Tagen vorgesetzt, im Versuch Nr. 13 10 Tiere 40 ml; der Titer dieses Impfstoffes war jedoch um  $0,75 \log_{10} \text{KID}_{50}$  niedriger. Ein Impferfolg konnte bei beiden Versuchen praktisch nicht festgestellt werden. Es erlagen im Versuch Nr. 12 alle, im Versuch Nr. 13 9 der 10 immunisierten Tiere. Der Impferfolg verbesserte sich auch dann nicht entscheidend, als 40 ml des Gemisches an 10 Tiere zehnmal verabreicht wurden (Versuch Nr. 14). Nur 2 Vögel überlebten die Testinfektion.

5.2.2.5. Spray-Vakzination mit den Stämmen KP 1 att. und Kanapox<sup>R</sup>:

3 ml Impfstoff der 545. Passage des Stammes KP 1 att. wurden zweimal im Abstand von 8 Tagen auf 10 Vögel versprayed (Versuch Nr. 15). Von der 550.

Passage verwendeten wir dazu bei gleichem Impfschema 6 ml (Versuch Nr. 16). Der Impferfolg war praktisch gleich; beim Versuch Nr. 15 waren 4 von 10 Tieren, beim Versuch Nr. 16 4 von 9 Vögeln immun. Ein schlechteres Ergebnis brachte eine fünfmalige Aerosolvakzinierung an aufeinanderfolgenden Tagen mit der 550. Passage des gleichen Stammes, wobei für jede Immunisierung 3 ml Impfstoff verwendet wurden. Nur 2 von 7 Versuchstieren waren geschützt (Versuch Nr. 17).

Wesentlich bessere Ergebnisse erhielten wir durch die Aerosol-Vakzinierung mit dem Stamm Kanapox<sup>R</sup> (402. FHE-Passage).

In Versuch Nr. 18 wurden 7 Tiere fünfmal an aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 3 ml Aerosolimpfstoff immunisiert. 6 der 7 Tiere überlebten den Belastungsversuch. Die zweimalige Aerosolapplikation von je 6 ml an 4 Tiere (Versuch Nr. 19) schützte immerhin noch die Hälfte der Impflinge. Bei Versuch Nr. 16 - 19 kam als besondere Belastung für die Tiere noch hinzu, daß sie während der Immunisierungsversuche in die Mauser kamen. Diese hielt auch noch über die Zeit der Testinfektionen an.

5.2.3. Verlauf und Ergebnisse der Testinfektionen nach parenteralen Immunisierungen (vgl. Tabelle 6):

5.2.3.1. Kutane Immunisierung nach der Federfollikelmethode:

In Versuch Nr. 20 wurden 8 Vögel mit der 545. FHE-Passage des Stammes KP 1 att. zu immunisieren versucht. Impfreaktionen waren nicht festzustellen, die Testinfektion überlebte keines der Versuchstiere.

Tabelle 5:

Ergebnisse der Testinfektion bei nicht-parenteral  
immunisierten Tieren:

| Ver-<br>such<br>Nr. | Art des Impf-<br>stoffes, Titer<br>in KID <sub>50</sub> /ml      | Art der<br>Impfstoff-<br>applika-<br>tion | verabreichte<br>Impfstoffdo-<br>sis in ml | Anzahl/<br>Abstand<br>der Vak-<br>zinatio-<br>nen | Anzahl<br>der<br>Ver-<br>suchs-<br>tiere | Nach Test-<br>inf.<br>Überle-<br>bende /<br>Gestor-<br>bene |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1                   | 540. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>8.25</sup>                         | intraoeso-<br>phageal                     | 1,0/Tier                                  | 2/8 Tage                                          | 7                                        | 6/1                                                         |
| 2                   | 545. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>8.25</sup>                         | intraoeso-<br>phageal                     | 1,0/Tier                                  | 2/8 Tage                                          | 23                                       | 6/17                                                        |
| 3                   | 540. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>8.25</sup>                         | kloakal                                   | 0,2/Tier                                  | 2/8 Tage                                          | 6                                        | 3/3                                                         |
| 4                   | 545. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>8.25</sup>                         | kloakal                                   | 0,2/Tier                                  | 2/8 Tage                                          | 45                                       | 12/33                                                       |
| 5                   | 402. FHE Kana-<br>pox <sup>R</sup> 10 <sup>5.75</sup>            | kloakal                                   | 0,2/Tier                                  | 5/1 Tag                                           | 4                                        | 3/1                                                         |
| 6                   | 402. FHE Kana-<br>pox <sup>R</sup> 10 <sup>5.75</sup>            | nasal                                     | 0,05/Tier                                 | 2/3 Tage                                          | 4                                        | 2/2                                                         |
| 7                   | 540. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>8.25</sup>                         | Trink-<br>wasser                          | 20/8 Tiere                                | 2/8 Tage                                          | 8                                        | 2/6                                                         |
| 8                   | 545. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>8.25</sup>                         | Trink-<br>wasser                          | 30/15 Tiere                               | 2/8 Tage                                          | 15                                       | 4/11                                                        |
| 9                   | 541. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>8.75</sup>                         | Trink-<br>wasser                          | 30/15 Tiere                               | 5/1 Tag                                           | 15                                       | 2/13                                                        |
| 10                  | Gem. 547-549.<br>FHE KP 1<br>att. 10 <sup>6.0</sup>              | Trink-<br>wasser                          | 40/10 Tiere                               | 5/1 Tag                                           | 10                                       | 1/9                                                         |
| 11                  | Gem. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>6.0</sup>                          | Trink-<br>wasser                          | 40/10 Tiere                               | 10/1 Tag                                          | 10                                       | 6/4                                                         |
| 12                  | 402. FHE Kana-<br>pox <sup>R</sup> 10 <sup>5.75</sup>            | Trink-<br>wasser                          | 20/8 Tiere                                | 5/1 Tag                                           | 8                                        | 0/8                                                         |
| 13                  | Gem. 402., 404.<br>FHE Kanapox <sup>R</sup><br>10 <sup>5.0</sup> | Trink-<br>wasser                          | 40/10 Tiere                               | 5/1 Tag                                           | 10                                       | 1/9                                                         |
| 14                  | Gem. 402., 404.<br>FHE Kanapox <sup>R</sup><br>10 <sup>5.0</sup> | Trink-<br>wasser                          | 40/10 Tiere                               | 10/1 Tag                                          | 10                                       | 2/8                                                         |
| 15                  | 545. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>8.25</sup>                         | Aerosol                                   | 3/10 Tiere                                | 2/8 Tage                                          | 10                                       | 4/6                                                         |
| 16                  | 550. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>6.50</sup>                         | Aerosol                                   | 6/9 Tiere                                 | 2/8 Tage                                          | 9                                        | 4/5                                                         |
| 17                  | 550. FHE KP 1<br>att. 10 <sup>6.5</sup>                          | Aerosol                                   | 3/7 Tiere                                 | 5/1 Tag                                           | 7                                        | 2/5                                                         |
| 18                  | 402. FHE Kana-<br>pox <sup>R</sup> 10 <sup>5.75</sup>            | Aerosol                                   | 3/7 Tiere                                 | 5/1 Tag                                           | 7                                        | 6/1                                                         |
| 19                  | 402. FHE Kana-<br>pox <sup>R</sup> 10 <sup>5.75</sup>            | Aerosol                                   | 6/4 Tiere                                 | 2/8 Tage                                          | 4                                        | 2/2                                                         |

5.2.3.2. Intrakutane Immunisierung nach der Wing-Web-Methode:

Beide Impfstämme kamen zur Anwendung. Von 9 mit der 545. FHE-Passage des Stammes KP 1 att. geimpften Vögeln reagierten 3 mit einer angedeuteten Impfreaktion, 6 der Tiere dagegen gar nicht. Auch die bei ihnen 10 Tage später durchgeführte Revakzination war nur von undeutlichen Impfreaktionen gefolgt. Nur die Tiere, die auf die Erstimpfung reagiert hatten, überlebten den Belastungsversuch.

Alle 8 mit dem Stamm Kanapox<sup>R</sup> auf gleiche Weise immunisierten Tiere zeigten deutliche Impfpocken. Die Testinfektion überlebten alle Impflinge.

5.2.3.3. Intramuskuläre Impfapplikation des Stammes KP 1 att.:

Mit 0,1 ml der 545. FHE-Passage dieses Stammes impften wir 8 Vögel intramuskulär. Impfreaktionen waren bei keinem der Tiere festzustellen. Die Testinfektion überstanden alle acht immunisierten Vögel.

Tabelle 6:

Ergebnisse der Testinfektion bei parenteral  
immunisierten Tieren:

| Ver-<br>such<br>Nr. | Art des Impf-<br>stoffes und<br>Titer in<br>KID <sub>50</sub> /ml | Art der<br>Impf-<br>stoff-<br>appli-<br>kation | verab-<br>reichte<br>Impfstoff-<br>dosis | Anzahl<br>der Vak-<br>zinatio-<br>nen | Impf-<br>reaktion                     | Anzahl<br>der<br>Ver-<br>suchs-<br>tiere | Nach Tes-<br>inf.<br>Überlebe-<br>nde / Ge-<br>storbene |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 20                  | 545. FHE<br>KP 1 att.<br>10 <sup>6.25</sup>                       | Feder-<br>foll.                                | 0,1 ml/<br>Tier                          | 1                                     | keine                                 | 8                                        | 0/8                                                     |
| 21                  | 545. FHE<br>KP 1 att.<br>10 <sup>6.25</sup>                       | Wing-<br>Web                                   | Kan.in<br>Impfstoff<br>get.              | 1<br>z.T.<br>2                        | leichte<br>Rötung<br>und<br>Schwellg. | 9                                        | 3/6                                                     |
| 22                  | 400. FHE<br>Kanapox <sup>R</sup><br>10 <sup>5.0</sup>             | Wing-<br>Web                                   | dto.                                     | 1                                     | deutl.I.<br>pocken                    | 8                                        | 0/0                                                     |
| 23                  | 545. FHE KP 1<br>10 <sup>6.25</sup> att.                          | intra-<br>musk.                                | 0,1 ml/<br>Tier                          | 1                                     | keine                                 | 8                                        | 8/0                                                     |

5.3. Besprechung der Ergebnisse:

Die bisherigen Vakzinationsmethoden gegen Kanarienspocken sind sehr arbeitsaufwendig und nicht problemlos. Deshalb sollten in vorliegender Arbeit die auf dem Gebiet der Immunprophylaxe derzeit im Mittelpunkt stehenden nicht-parenteralen Immunisierungsverfahren vergleichend mit den bisher üblichen parenteralen Vakzinationstechniken unter Anwendung des weniger attenuierten Stammes Kanapox<sup>R</sup> und des hochattenuierten Stammes KP 1 att. getestet werden. Wir führten die Tierversuche an insgesamt 402 männlichen und weiblichen Kanarienvögeln durch, von denen 245 vakziniert wurden.

Die Ergebnisse belegen die prinzipielle Möglichkeit, auch auf nicht-parenteralem Weg Kanarienvögel gegen Kanarienspocken zu immunisieren. Ein Impferfolg ist allerdings von einer ganzen Reihe von Faktoren abhängig, die in ihrer Gesamtheit nicht vollständig geklärt werden konnten. Wir sind uns darüber hinaus der Problematik sehr wohl bewußt, aus Versuchen mit kleinen Tiergruppen definitive Schlüsse zu ziehen. Gewisse Zusammenhänge zwischen dem Ausgang der Testinfektionen und damit des Impferfolges einerseits, dessen Abhängigkeit von der angewendeten Impfmethode, der Art der Impfstoffe und deren Titerhöhe andererseits lassen sich jedoch feststellen.

So scheint einmal die 540. FHE-Passage des Stammes KP 1 att. nach intraoesophagealer Applikation bei gleichem Virusgehalt besser immunogen zu wirken als die 545. FHE-Passage (Versuch Nr. 1 und 2). Eine gleichartige Abhängigkeit von der Passagezahl läßt sich auch bei der kloakalen Vakzinierung (Versuch Nr. 3 und 4) ableiten. Noch besser immu-

nisierte bei diesem Impfmodus der Virusstamm Kana-pox<sup>R</sup>, der erst 402 mal in FHE-Kulturen passiert worden war, allerdings auch fünfmal appliziert wurde.

Eine Abhängigkeit von der Passagezahl konnten wir bei der Verabreichung der Impfstoffe als Trinkwasser-Vakzine nicht feststellen. Auch war insgesamt der Immunisierungseffekt schlechter als nach intraoesophagealer und kloakaler Vakzinierung. Das beste Ergebnis bei der Trinkwasser-Vakzinierung wurde mit dem Stamm KP 1 att. erzielt (Versuch Nr. 11), der zehnmal in täglichem Abstand in einer Menge von 4 ml pro Tier (vereinigte 547. - 549. FHE-Passagen, Titer  $10^{6.0} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ ) verabfolgt wurde. Nicht so häufige Revakzination und/bzw. geringere Dosierungen erbrachten schlechtere Resultate. Diese Versuchsergebnisse, wie auch die Angaben verschiedener Autoren über die Verhältnisse bei anderen Virusinfektionen sprechen dafür, daß bei dieser Impfmethode der Erfolg von der verabfolgten Impfstoffmenge und der Höhe des Virusgehalts pro ml abhängig ist.

Der Arbeitskreis um Mayr (13, 56, 57, 64) benutzte zur oralen Immunisierung gegen Hühnerpocken attenuiertes, homologes Gewebekulturyrus in einer Dosierung von  $4 \times 10^{5.3}$  bis  $4 \times 10^{6.3} \text{EID}_{50}$ . Ein 100 %-iger Impfschutz wurde bei Küken allerdings erst bei zweimaliger Applikation im Abstand von 3 Wochen von jeweils  $10^8 \text{KID}_{50}$ , ein solcher von 75 % durch jeweils  $10^7 \text{KID}_{50}$  erzielt.

Hochstein-Mintzel und Mitarbeiter (37) bemerkten bei Mäusen weder nach einmaliger peroraler Applikation von Vaccinia-Virus ( $10^8$  pockenbildende Einheiten (CAM)), noch nach bis zu zehnmaliger Verabreichung von  $10^5$  Einheiten einen überzeugenden Schutz gegen eine intracerebrale homologe Infektion mit 1000 LD<sub>50</sub> (i.cer.Maus), wenn auch mit steigender Dosis und steigender Anzahl von Applikationen die Schutzwirkung zunahm.

Munz et al. (61) erreichten selbst durch eine dreimalige Verabreichung einer Trinkwasser-Vakzine

verschiedener Vaccinia-Virusstämme mit Titern von 106.75 bzw. 107.5 KID<sub>50</sub> nur einen unzureichenden Schutz von Mäusen gegen eine Ektromelie-Infektion. Sie konnten dagegen einen wesentlich besseren Immunisierungseffekt nach dreimaliger Sondenapplikation der Impfstoffe erzielen.

Mayr und Mitarbeiter (56) bemerkten dagegen eine schlechtere Immunisierung von Küken gegen Geflügelpocken bei Verabreichung des Impfstoffes mittels Pipette im Vergleich zur Trinkwasser-Vakzinierung aus Rinnentränken. Sie vermuten als Ursache ein zu schnelles Abschlucken des Impfstoffes, das nicht zu einem intensiven Kontakt des Virus mit der Schleimhaut des oberen Verdauungs- und Respirationstraktes führt.

Munz et al. (61) nehmen an, daß der unterschiedliche Immunisierungseffekt bei einer Trinkwasser-vakzinierung durch die artspezifische Flüssigkeitsaufnahme bedingt wird: Hühner benetzen beim Trinken aus Rinnentränken oft die Nasenöffnung, so daß Virus zum respiratorischen Epithel gelangt; Mäuse nehmen dagegen Flüssigkeit vornehmlich mit der Zunge auf. Dabei kommen ohne Kontakt mit respiratorischem Epithel nur geringe Virusmengen in den Magen, wo sie rasch inaktiviert werden können. Bei einer oesophagealen Sonden-Vakzinierung passieren dagegen relativ große Impfstoffvolumina den Magen, ohne dabei vom sauren Magensaft erheblich beeinflußt zu werden. Der Immunisierungsvorgang setzt dann überwiegend im Darm nach Per-sorption ein.

Huber und Mitarbeiter (39) stellten bei Affen fest, daß mit einer Sonde intragastral verabreichte, sehr hohe Vaccinia-Virusdosen besser gegen Variola, immunisierten, als über Kapseln appliziertes Virus. Offenbar war der Immunisierungseffekt dann am besten, wenn eine raschere Verteilung des Impfvirus über größere Magen- oder Darmabschnitte erreicht werden konnte.

Wir glauben, daß diese Umstände auch bei unseren Versuchen für das bessere Abschneiden der oesophagealen Immunisierung gegenüber der Trinkwasser-Vakzinierung verantwortlich sind. Bei ersterer applizierten wir in kurzer Zeit große Impfstoffdosen, bei letzterer wurden über einen längeren Zeitraum nur kleine Virusdosen aufgenommen. Dazu kommt, daß der Flüssigkeitsspiegel in den Stülptränken so niedrig war, daß es in der Regel nur zu einer ora-

len Aufnahme des Virus, nicht aber gleichzeitig zu einem Kontakt des Impfvirus mit dem respiratorischen Epithel kommen konnte.

Der Nasen-Rachenraum hat demnach, wie auch Untersuchungen bei der Immunisierung gegen die Atypische Geflügelpest zeigen, für das Haften von Antigenen und damit für einen guten Immunisierungseffekt eine besondere Bedeutung. So konnten Monreal und Mitarbeiter (60) belegen, daß der Erfolg der Immunisierung eines Kollektivs nicht nur von der applizierten Minimaldosis abhängig ist, sondern auch von den Organsystemen, die ein Impfvirus erreicht.

Die Autoren fanden, daß bei streng oraler Aufnahme von ND-Trinkwasser-Vakzine eine wesentlich höhere Dosis zur erfolgreichen Immunisierung nötig war als bei einer gleichzeitigen oral-nasalen Applikation, wobei der Impfstoff sowohl in die Nasenhöhle als auch in den Schnabel getropft wurde. Eine direkte Kropfinstillation löste nur vereinzelt eine niedere Antikörperantwort aus. Die geringste immunogene Dosis war bei einer trachealen Impfstoffapplikation erforderlich. Sie gilt als Modell für eine Spray-Vakzination. Hier genügten  $2 \times 10^3 \text{EID}_{50}$ , um 14 Tage p.vacc. bei allen Tieren eine deutliche Antikörperreaktion hervorzurufen. Bei der oral-nasalen Infektion waren dagegen mindestens  $2 \times 10^4$ , bei streng oraler Applikation  $2 \times 10^6 \text{EID}_{50}$  nötig, um diesen Effekt zu erzielen. Die Autoren vergleichen die orale Impfstoffapplikation in ihren Versuchen mit der natürlichen Aufnahme des Impfstoffes aus Nippeltränken, die oral-nasale Verabreichung mit der Aufnahme aus Rinnentränken. Die direkte Kropfinstillation sollte schließlich die Situation einer Aufnahme des Virus aus Nippeltränken simulieren, wenn das Impfvirus ohne Aufenthalt in der Schnabelhöhle direkt in den Kropf abfließt.

Hochstein-Mintzel et al. (37) beobachteten ebenfalls eine erheblich besser immunisierende Wirkung von Vaccinia-Virus bei Kaninchen und Mäusen gegen eine homologe kutane bzw. intracerebrale Reinfektion nach nasaler bzw. oral-nasaler Impfstoffapplikation als nach rein oraler Verabreichung.

In diesem Zusammenhang interessieren auch die Ergebnisse von Testinfektionen nach oraler, nasaler und parenteraler Immunisierung von Katzen gegen eine Panleukopenie-Infektion. Schultz und Scott (68) fanden eine orale Applikation eines modifizierten Lebendimpfstoffes wirkungslos, während nach nasaler und subkutaner Impfung sowohl hohe Antikörpertiter hervorgerufen wurden als auch ein sicherer Infektionsschutz vermittelt wurde.

Auch wir konnten bei einer nasalen und Aerosol-Applikation der Impfstoffe einen im Durchschnitt wesentlich besseren Schutz erzielen als nach Trinkwasser-Vakzinierung. Bei der Aerosol-Vakzinierung traten allerdings auch Unterschiede in der immunogegen Wirkung der beiden Impfstoff-Stämme auf. Der Stamm Kanapox<sup>R</sup> schützte gegen eine Testinfektion selbst bei geringerem Virusgehalt besser als der höher passierte Stamm KP 1 att..

Die gegenüber einer Trinkwasser-Vakzinierung wirksamere aerogene und nasale Immunisierung kommt auch im Vergleich der verabreichten Impfstoffdosen zum Ausdruck. Während die maximale Dosis bei der Trinkwasser-Impfung pro Tier etwa 40 ml, entsprechend  $4 \times 10^{7.25} \text{KID}_{50}$  (bei 10 Vakzinationen) betrug, wurden zur nasalen Applikation maximal 0,1 ml, entsprechend  $10^{4.75} \text{KID}_{50}$  (bei 2 Vakzinationen) und zur Aerosol-Immunisierung maximal 3 ml, entsprechend  $3 \times 10^{5.75} \text{KID}_{50}$  (bei zusammen 5 Applikationen) verwendet, wobei ohne Berücksichtigung bleibt, daß bei der Aerosolimpfung nur ein Teil des versprühten Impfvirus von den Versuchstieren aufgenommen wird.

Der Einfluß der verwendeten Impfstoffe auf den Ausgang der Testinfektionen tritt besonders deutlich bei den kutan immunisierten Tieren auf. Hier war die Applikation der 545. FHE-Passage des Stammes KP 1 att. in die Federfollikel weder von einer Impfreaktion gefolgt, noch löste sie eine Immuni-

tät aus. Bei intrakutaner Impfung nach der Wing-Web-Methode traten nur bei 3 von 9 Vögeln Impfreaktionen auf. Diese Tiere waren gegen eine nachfolgende Testinfektion geschützt. Die Revakzination von 6 Tieren war weder von einer Impfreaktion gefolgt, noch erwiesen sich diese Tiere als immun.

Ein Vergleich mit dem Stamm Kanapox<sup>R</sup> (400. FHE-Passage), der nach Anwendung der gleichen Methode bei allen Impfungen deutliche Impfpocken hervorrief, und einen 100 %-igen Impfschutz brachte, läßt vermuten, daß die schwach immunogene Wirkung des Stammes KP 1 att. auf einen Verlust seiner dermotropen Eigenschaften zurückzuführen ist, so daß er sich nicht mehr zur kutanen bzw. intrakutanen Immunisierung eignet. Der Ausgang des Versuches Nr. 23 stützt diese Annahme: Intramuskulär verabreichtes Virus der 545. FHE-Passage des Stammes KP 1 att. schützte alle Versuchstiere, ohne daß Impfreaktionen auftraten.

Eine Beurteilung der hier mitgeteilten Immunisierungsergebnisse muß auch die Art und Schwere der zur Prüfung der Immunität angewendeten Testinfektion berücksichtigen.

Alle immunisierten Tiere wurden mit einer so hohen Dosis von virulentem Virus infiziert, daß die Kontrollen stets regelmäßig zwischen dem 9. und 12. Tag p.i. der septikämischen Form der Kanarienvogelcholera erlagen.

Dabei war auch die Art der Applikation des virulenten Virus von entscheidender Bedeutung: Die intramuskuläre Infizierung stellt die schwerste Belastungsprobe dar; sie garantiert ein Angehen der Infektion innerhalb einer befristeten Inkubationszeit, und es entwickelt sich dabei in der Re-

gel der septikämische Krankheitsverlauf. Die Diagnose konnte durch Isolierung des Erregers aus Organverreibungen und durch seinen elektronenoptischen Nachweis in Ödemflüssigkeit der Brustmuskulatur gesichert werden. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Erfahrungen von Mayr et al. (55), wonach sich der Attenuierungsvorgang und -erfolg, d.h. der Virulenzverlust von Kanarienvogelstämmen am besten durch intramuskuläre Applikation der Viruspassagen ermitteln lassen.

Eine kutane und aerogene Infektion mit virulentem KPV führt dagegen zu uneinheitlichen Inkubationszeiten und zu Unterschieden in der Schwere und im Verlauf der Krankheit. Wegen dieser Unsicherheiten verzichteten wir darauf, über kutane Testinfektionen auf eine Immunität zu schließen.

Da zudem serologische Verfahren zur Überprüfung der Immunität nicht durchführbar sind, wurde eine sicher wirkende Infektionsdosis und eine entsprechende Applikationsform gewählt, um einen Infektionsschutz bewerten zu können.

Eine den Versuchsbedingungen vergleichbare Belastungsprobe dürfte aber unter natürlichen Verhältnissen kaum in einem Bestand auf jeden Vogel treffen.

Wir halten deshalb den nach intraoesophagealer, kloakaler und Aerosol-Verabreichung erzielbaren Impfschutz für ausreichend, um Kanarienvogelbestände vor dem verlustreichen Auftreten einer Pockeninfektion zu schützen.

Folgende Aspekte bezüglich einer praktischen Anwendung der verschiedenen Immunisierungsmethoden ergeben sich aus den Vergleichsuntersuchungen:

Neben der derzeit üblichen Wing-Web-Methode sollte auch einer Aerosol-Vakzinierung vermehrt Beachtung geschenkt werden. Sie verleiht einen guten Impfschutz und könnte zur Immunisierung größerer Tierbestände angewandt werden. Die ebenfalls wirksame kloakale und nasale Impfung bietet arbeitstechnisch insofern Vorteile, als nicht mehr auf Impfreaktionen untersucht werden müßte. Dies trifft auch für die intramuskuläre Impfung zu, die einen der Wing-Web-Methode völlig gleichwertigen Schutz vermittelt. Allerdings sind dafür anscheinend nur besonders hoch in FHE-Kulturen passierte (mehr als 450 Passagen) und stark attenuierte Virusstämme geeignet. Die Anwendung niedrigerer Passagen ist bei der intramuskulären Applikation mit Impfschäden belastet, doch können sie zur kutanen bzw. intrakutanen Impfung verwendet werden.

Eine intraoesophageale Verabreichung des Impfstoffes vermag zwar einen guten Impfschutz zu vermitteln, doch ist dieses Verfahren für die Praxis zu umständlich. Eine Vakzinierung über das Trinkwasser bringt mit den derzeit zur Verfügung stehenden Impfstoffen nur unsichere Ergebnisse. Der praktischen Anwendung dieses Verfahrens steht ferner entgegen, daß außerordentlich hohe Virusdosen mehrmals verabfolgt werden müssen.

### Zusammenfassung

245 Kanarienvögel wurden mit den attenuierten Kanarienspocken-Virusstämmen KP 1 att. (540. - 550. Passage in Hühnerembryo-Fibroblasten-Kulturen (FHE), Titer  $10^{5.75}$  -  $10^{6.5}$  KID<sub>50</sub>/ml) und Kanapox<sup>R</sup> (400. - 404. FHE-Passage, Titer  $10^{5.0}$  -  $10^{5.75}$  KID<sub>50</sub>/ml) gegen eine Kanarienspockeninfektion geschützt. Dabei kamen parenterale (kutan, intrakutan, intramuskulär) und nicht-parenterale (intraoesophageal, kloakal, nasal, Trinkwasser und Aerosol) Immunisierungsverfahren zur Anwendung.

Die Unschädlichkeit der Impfstoffe wurde durch klinische Beobachtung und Probesektionen, ihre Wirksamkeit durch intramuskuläre Testinfektionen mit  $10^{3.25}$  LD<sub>50</sub> des virulenten Kanarienspockenstammes KP 1, 14 bzw. 21 Tage p.vacc. geprüft.

Die Auswertung brachte folgende Ergebnisse:

1. Mit Ausnahme der intramuskulären Verimpfung des Stammes Kanapox<sup>R</sup> erwiesen sich alle Applikationsformen bei beiden Impfstoffen als unschädlich.
2. Eine sichere, nicht mit Impfdurchbrüchen belastete Immunität wurde durch intrakutane Applikation (Wing-Web-Methode) des Stammes Kanapox<sup>R</sup> und durch intramuskuläre Verabreichung des Stammes KP 1 att. erzielt. Diese Methode bedeutet eine wesentliche Erleichterung der bisherigen Impfpraxis, weil auf eine Nachschau verzichtet werden kann.
3. Kutane (Federfollikel-Methode) und intrakutane Impfungen mit dem Stamm KP 1 att. führten zu keinen oder nur unzulänglichen Impfreaktionen und deshalb zu unsicherem Impfschutz.

4. Prinzipiell sind auch nicht-parenterale Immunisierungsverfahren wirksam. Dabei erwiesen sich die intraoesophageale, kloakale, nasale und Aerosolapplikation der Impfstoffe in der Regel einer Trinkwasser-Vakzinierung, bei der nur eine orale Aufnahme der Impfstoffe möglich war, überlegen. Hier führten selbst sehr hohe Impfvirusdosen in mehrmaliger Applikation nur zu einem unsicheren Immunisierungseffekt. Eine Verbesserung des Impfschutzes dürfte dann erreichbar sein, wenn auch respiratorisches Epithel am Immunisierungsvorgang beteiligt wird.
5. Eine weitere Ausarbeitung der Aerosol-Impfung erscheint erfolgversprechend; die Methode könnte besonders zur Impfung von Großbeständen geeignet sein.
6. Bei Anwendung nicht-parenteraler Impfverfahren war die immunogene Wirkung der Impfstoffe anscheinend auch vom Grad der Attenuierung abhängig.

Summary:

244 canaries were vaccinated against a canary pox infection with the attenuated canary pox virus strains KP 1 att. (540. - 550. passage in chicken-embryo-fibroblasts (CEF), titer  $10^{5.75}$  -  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml) and Kanapox<sup>R</sup> (400. - 404. CEF-passage, titer  $10^{5.0}$  -  $10^{5.75}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Parenteral methods of immunization (cutaneous, intracutaneous, intramuscular) and non-parenteral ones (intraesophageal, cloacal, nasal, drinking-water, and aerosol) were applied.

The harmlessness of the vaccines was proved by clinical observation and post mortem examinations. The efficiency of the vaccines was proved by intramuscular inoculations using  $10^{3.25}$  LD<sub>50</sub> of the virulent canary pox virus strain KP 1 vir., 14 resp. 21 days p.vacc..

The results of the evaluation are as follows:

1. All vaccination methods were harmless with both vaccines except the intramuscular application of the strain Kanapox<sup>R</sup>.
2. A reliable immunity, where no failure vaccinations were to be observed, was attained by intracutaneous application (Wing-Web-method) of strain Kanapox<sup>R</sup> and by intramuscular vaccination of strain KP 1 att.. This method is a essential facilitation of the present method of vaccination, because a control of the vaccinations success can be renounced.
3. Cutaneous (feather-follicel) and intracutaneous vaccinations with KP 1 att. showed no or only insufficient reactions and therefore an unreliable immune status.

4. On principle, non-parenteral methods of immunization were effective, too.

Within these the intraesophageal, cloacal, nasal, and aerosol application of the vaccines normally proved to be superior to the vaccination via drinking-water, in which only an oral intake of vaccines was possible. In this case even very high doses of vaccine virus given several times showed a rather unreliable effect of immunization. An improvement of the vaccination success could be attained including the respiratoric epithelium in the process of immunization.

5. A more intensive elaboration of the aerosol vaccination promises to be successful; this method could be advantageous for the vaccination of large live-stocks.
6. Using non-parenteral methods of vaccination the immunogenicity seemed to depend on the degree of attenuation.

5.5. Literaturverzeichnis:

1. Ackermann, O.                      Bessere Immunisierungsmöglichkeiten bei Nerzen gegen Staupe. Dtsch.tierärztl. Wschr. 73,11 (1966)
2. Baer, G.M., Abelseth, M.K. and Debbie, J.G.      Oral vaccination of foxes against rabies. Amer.J.Epidemiol. 93,487 (1971)
3. Baer, I.                              Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung einer Lebendvakzine gegen die Kanarienvpocken. Inaug.Diss.Univ.München (1966)
4. Beaudette, F.R.                      zit. nach: de Bliëk, L. Immunisation gegen Geflügelvocken. Berl.Munch.tierärztl. Wschr. 68,65 (1955)
5. Bieling, R. und Beller K.              Pocken der Sperlingsvögel. In: Viruskrankheiten der Haus- und Labortiere. J.A. Barth Verlag, Leipzig (1950)
6. Bighland, C.H., Wenham, G.R. and Graesser, F.E.              A poxlike infection of canaries: Report of an outbreak. Canad.vet.J. 2,347 (1962)
7. de Bliëk, L.                              Immunisation gegen Geflügelvocken. Berl.Munch.tierärztl.Wschr. 68, 65 (1955)
8. Burnet, F.M. and Barnard, J.E.              A virus disease of the canary of the fowlpox group. J.Path.Bact. 7,107 (1933)
9. Burnet, F.M. and Lush, D.                      The immunological relationship between Kikuth's canary virus and fowl pox. Brit.J.exp.Path. 17,302 (1936)
10. Cavill, J.P.                              Canary pox: Report of an outbreak in roller canaries. Vet.Rec. 76,463 (1964)

11. Correa-Giron, E.P., Allen, R. and Sulkin, S.E.      The infectivity and pathogenesis of rabies virus administered orally. Amer. J. Epidemiol. 91, 203 (1970)
12. Coulston, F. and Manwell, R.D.      Successful chemotherapy of a virus disease of the canary. Amer. J. vet. Res. 2, 101 (1941)
13. Danner, K. und Mayr A.      Perorale Immunisierung gegen Pocken. 3. Mitteilung: Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg bei der Trinkwasservakzinierung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten Stamm HP-1. Zbl. Vet. Med. B 19, 609 (1972)
14. Debbie, J.G., Abelseth, M. K. and Baer, G.M.      The use of commercially available vaccines for the oral vaccination of foxes against rabies. Amer. J. Epidemiol. 96, 231 (1972)
15. Dorn, P.      Die Newcastle-Krankheit und ihre Immunprophylaxe. Tierärztl. Praxis 1, 43 (1973)
16. Dorn, P.      Handbuch der Geflügelkrankheiten  
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (1971)
17. Dulbecco, R.      Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of animal virus. Proc. nat. Acad. Sci 38, 362 (1952)
18. Eberbeck, E. und Kayser, W.      Über das Vorkommen von Pocken-erkrankungen bei Kanarienvögeln, Buchfinken und Sperlingen. Arch. Tierheilk. 65, 307 (1932)
19. Fenner, F. and Burnet, F.M.      A short description of the poxvirus group (Vaccinia and related viruses) Virology 4, 305 (1957)

20. Gaede, H. Über die Natur des Kikuth'schen Kanarienvogelvirus. Zbl.Bakt.I.Orig. 135,342 (1935/36)
21. Gerber, D.F. and Watkins, H.M.S. Hemagglutination and hemagglutination inhibition by normal serum with a canary pox strain. J.Immunol. 81,439 (1958)
22. Giddens, W.E., Swango, L.J., Henderson, J.D., Lewis, R.A., Farner, D.S. Carlos, A. and Dolowy, W.C. Canary pox in sparrows and canaries (Fringillidae) and in weavers (Ploceidae). Pathology and host specificity of the virus. Vet.Path. 8,260 (1971)
23. Grund, S., Kraft, V. und Monreal G. Zur Feinstruktur des Agarnidenpockenvirus. Arch.ges.Virusforsch.41,319 (1973)
24. Hansen-Krüger, U. Gehäuftes Auftreten von Kanarienvogelkrankheiten im Raum Südhessen. Tierärztl. Umschau 19,74 (1964)
25. Hartig, F. Ein Beitrag zur Epidemiologie, Klinik und Immunologie der Kanarienvogelkrankheiten. Fa.Dr.Rentschler u. Co.: Mitteilungen für Tierärzte, Folge 123/124 (1966)
26. Hartig, F. und Hebold, G. Beitrag zur Pathologie der Lungenform der Kanarienvogelkrankheiten. Berl. Münch.tierärztl.Wschr. 85,352 (1972)
27. Hartig, F. und Frese, K. Tumorförmige Tauben- und Kanarienvogelkrankheiten. Zbl.Vet.Med.B 20,153 (1973)
28. Hartwig, H. und Lange, W. Vaccinierungsversuch bei Kanarienvögeln gegen Pocken. Dtsch.tierärztl.Wschr. 71,180 (1964)

29. Herrlich, A. Die Pocken  
2. Auflage  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967)
30. Herzberg, K. Kultur und mikroskopische  
Darstellung des von Kikuth  
beschriebenen Kanarien-  
pockenvirus.  
Zbl.Bakt.I.Orig. 130,183  
(1933/34)
31. Herzberg, K. und Kleinschmidt, A. Elektronenmikroskopische Un-  
tersuchungen am Kanarienspock-  
kenvirus; Teil I  
Z.Hyg. 139,545 (1954)
32. Herzberg, K., Kleinschmidt, A.,  
Requardt, K. und Vogell, W. Elektronenmikroskopische Un-  
tersuchungen am Kanarienspock-  
kenvirus; Teil II Arch.ges.  
Virusforsch. 6,283 (1956)
33. Herzberg, K. und Kleinschmidt, A. Elektronenmikroskopische Un-  
tersuchungen am Kanarienspock-  
kenvirus; Teil III: Dünn-  
schnittbefunde.  
Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B 174,1  
(1959)
34. Herzberg, K., Kleinschmidt, A., Lang  
D. und Reuss, K. Vaccinevirus und Kanarienspock-  
kenvirus elektronenmikrosko-  
pisch bei Negativkontrastie-  
rung.  
Die Naturwissensch. 48,725  
(1961)
35. Hochstein-Mintzel, V. Die orale und nasale Immuni-  
sierung mit Poxvirus vacci-  
niae.  
I. Mitteilung: Die Kriterien  
der Pockenimmunität und  
die Immunologie der konven-  
tionell-kutanen Impfreak-  
tion.  
Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B 156,1  
(1972)
36. Hochstein-Mintzel, V. Die orale und nasale Immuni-  
sierung mit Poxvirus vac-  
ciniae.  
II. Mitteilung: Neue Wege  
der Pockenimpfung.  
Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B 156,15  
(1972)

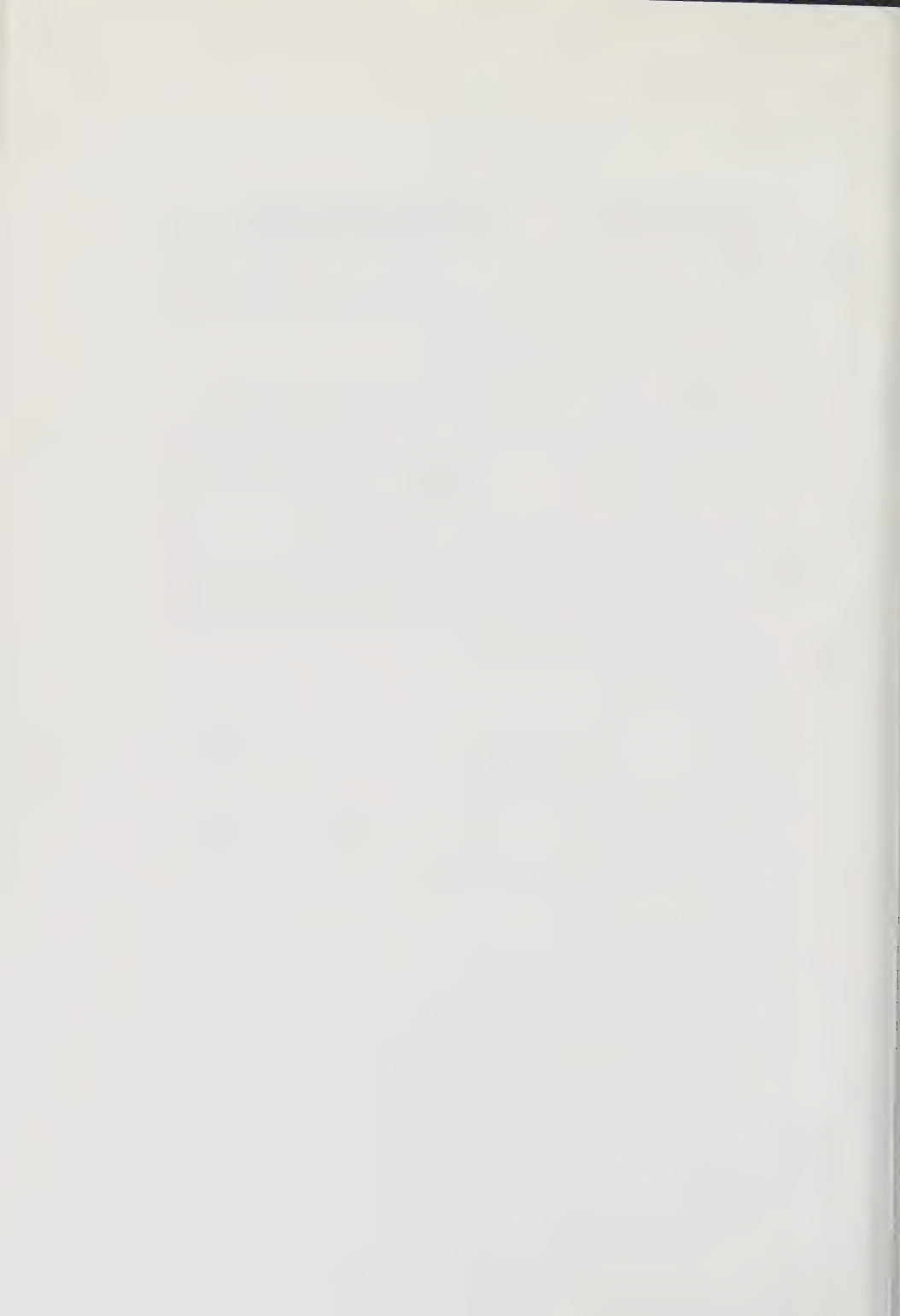
37. Hochstein-Mintzel, V. Die orale und nasale Immunisierung mit Poxvirus vaccinia. III. Mitteilung: Tierexperimentelle Untersuchungen. Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B 156, 30 (1972)
38. Hoekstra, J. und Smit, T. Immunisatie tegen kanariepox-ken. Tijdschr. Diergeneesk. 86, 243 (1961) zit.in: Röhrer, Handbuch der Virusinfektionen der Tiere, Band II Gustav Fischer Verlag, Jena (1967)
39. Huber, H.Chr., Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V. und Rauchenberger P. Die orale und nasale Immunisierung mit Poxvirus vaccinia. IV. Mitteilung: Untersuchungen bei oraler Immunisierung von Affen. Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B 157, 102 (1973)
40. Jacotot, H., Vallee, A. jun. et Reinlie, L. zit.in: Hartig, F.: Ein Beitrag zur Epidemiologie, Klinik und Immunologie der Kanarienvogel-Pocken. Fa.Dr. Rentschler u. Co.: Mitteilungen für Tierärzte, Folge 123/124
41. Kärber, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn Schmiedbergs Arch.exp.Path. Pharmac. 162, 480 (1931)
42. Karczewski, W. Investigations on the effectiveness of vaccination against Newcastle disease in broiler farms. I. Attempt of explanation of immunity breaking cases. Bull.vet.Inst.Pulawy 16, 74 (1972) ref.in: Vet.Bull. 43, 2529 (1973)
43. Kikuth, W. und Gollub, H. Versuche mit einem filtrierbaren Virus bei einer übertragbaren Kanarienvogelkrankheit. Zbl.Bakt.I.Orig. 125, 313 (1932)

44. Kirmse, P. Host specificity and long persistence of pox infection in the flicker (*Colaptes auratus*)  
Bull.Wildl.Dis.Ass. 3,14  
(1967)
45. Kirmse, P. Avian pox in migrant and native birds in Panama.  
and Loftin, H. Bull.Wildl.Dis.Ass. 5,103  
(1969)
46. Kraft, V. Untersuchungen zur Differenzierung eines von Zwergpapageien isolierten Pockenvirus.  
Inaug.Diss.Freie Univ.Berlin  
(1971)
47. Lahaye, A. zit. in: Eberbeck, E. und Kayser, W.: Über das Vorkommen von Pockenerkrankungen bei Kanarienvögeln, Buchfinken und Sperlingen.  
Arch. Tierheilk. 65,307 (1932)
48. Mahnel, H. persönliche Mitteilung (1973)
49. Mayr, A. und Zur Pathogenese der Hühnerpockeninfektion.  
Wittmann, G. Monatsh. Tierheilk. 8,264  
(1956)
50. Mayr, A. Verhalten von Hühner-, Tauben- und Kanarienspockenpockenvirus im Küken nach intravenöser Impfung.  
Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B 178,149  
(1960)
51. Mayr, A. und Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur.  
Kalcher, K. Arch.ges.Virusforsch. 10,72  
(1960)
52. Mayr, A. und Plaque-Bildung bei den Geflügelpockenviren.  
Kalcher, K. Arch.ges.Virusforsch. 11,21  
(1961)

53. Mayr, A. Untersuchungen über die Lagerfähigkeit von Geflügelpockenviren im nativen Zustand. Monatsh.Tierheilk. 14,332 (1962)
54. Mayr, A. Neue Verfahren für die Differenzierung der Geflügelpockenviren. Berl.Münch.tierärztl. Wschr. 76,316 (1963)
55. Mayr, A., Hartig, F. und ~~Mayr~~, I. Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Kanarienvpocken auf der Basis eines attenuierten Kanarienvpocken-Kulturvirus. Zbl.Vet.Med.B 12,41 (1965)
56. Mayr, A., Rath, M. und Danner, K. Perorale Immunisierung gegen Pocken; 1. Mitteilung: Untersuchungen über eine Schutzimpfung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten H-Stamm HP-1. Zbl.Vet.Med.B 18,347 (1971)
57. Mayr, A., Rath, M. und Danner, K. Perorale Immunisierung gegen Pocken; 2. Mitteilung: Untersuchungen über eine kombinierte Schluckimpfung gegen Hühnerpocken und Newcastle-Disease. Zbl.Vet.Med.B. 18,441 (1971)
58. Mayr, A., Mahnel, H. und Munz, E. Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren. Zbl.Vet.Med. B 19,69 (1972)
59. Mayr, A., Kraft, H., Jaeger, O. und Haacke, J. Orale Immunisierung von Füchsen gegen Tollwut. Zbl.Vet.Med.B 19,615 (1972)
60. Monreal, G. Kraft, V. und Baumer, J. Die minimale immunogene Dosis von lentogenem Newcastle-virus bei verschiedenen Infektionswegen. Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 85,453 (1972)

61. Munz, E., Reimann  
M., ~~Hoffmann, R.~~  
und ~~Göbel, E. R.~~ Perorale Immunisierungsver-  
suche mit Vaccinia-Virus  
gegen Mäusepocken.  
Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B 159 10, 1974
62. Pette, J., Witzigmann  
G. und Weisser, W. Untersuchungen über die Wirk-  
samkeit eines Parainfluenza-  
3-Lebend-Impfstoffes bei  
Kälbern.  
Berl.Münc.hierärztl.Wschr.  
77, 273 (1964)
63. Purcell, D.A.,  
Clarke, J.K.,  
McFerran, J.B. and  
Hughes, D.A. The morphogenesis of pigeon-  
pox virus.  
J.gen.Virol. 15, 79 (1972)
64. Rath, M. Experimentelle Untersuchungen  
über eine Trinkwasserschutz-  
impfung gegen die Hühner-  
pocken.  
Inaug.Diss.Univ.München (1971)
65. Röhrer, H. Handbuch der Virusinfektionen  
der Tiere, Band II.  
Gustav Fischer Verlag, Jena  
(1967)
66. Rolle, M. und  
Mayr, A. Mikrobiologie und allgemeine  
Seuchenlehre.  
3. Auflage  
Ferdinand Enke Verlag, Stutt-  
gart (1966)
67. Sato, T., Sugi-  
mori, T. and Ma-  
tumoto, M. Etiologic study on an out-  
break of canary pox in Japan  
1958.  
Jap.J.exp.Med. 32, 247 (1962)
68. Schultz, R.D.  
and Scott, F.W. Absence of an immune respon-  
se after oral administration  
of attenuated feline pan-  
leukopenia virus.  
Infect. Immunity 7, 547  
(1973)

69. Shattock, S.G. Molluscum contagiosum in two banting sparrows.  
Trans.Path.Soc.London 49,394 (1898) zit. in: Röhrer, H.: Handbuch der Virusinfektionen der Tiere.  
Gustav Fischer Verlag, Jena (1967)
70. Tripathy, D.N.,  
Hanson, L.E.  
and Killinger, A.H. Studies on differentiation of avian pox viruses.  
Av.Dis. 17,325 (1973)
71. Wellensiek, A.M. Pokken en diphtherie bij Kanaries. Tijdschr. Diergeneesk. 62,1299 (1935)  
ref. in: Zbl.Bakt.I.Ref. 123,237 (1936)
72. Infektionsschutz des Tieres. Kompendium für die Veterinärmedizin.  
Hildegard Hoffmann Verlag, Berlin 1. Auflage (1972)



Herrn Prof. Dr. E. Munz möchte ich für die Überlassung des Themas und die mir gewährte Unterstützung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn M. Reimann und Herrn Dr. E. Göbel für ihre bereitwillig geleistete Hilfe.

Bei der Zentralen Kommission für die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses möchte ich mich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums bedanken.

## LEBENS LAUF

Am 19.1.45 wurde ich, Hartmut Sailer, als Sohn des Rechtsanwaltes Dr. Max Sailer und seiner Ehefrau Irma, geb, Davidsen, in Ichenhausen geboren.

Von September 1951 an besuchte ich die Volksschule in Ichenhausen und trat im September 1955 in das Humanistische Gymnasium in Günzburg ein, wo ich im Juli 1964 das Abitur bestand.

Von Oktober 1964 bis September 1966 war ich bei der Bundeswehr.

Das Studium der Veterinärmedizin begann ich im Wintersemester 1966/67 in München, wo ich im August 1971 auch das Staatsexamen machte.

Von Oktober 1971 bis Dezember 1973 war ich als Doktorand am Institut für Vergleichende Tropenmedizin der Universität München.

Zur Zeit bin ich Assistent in einer tierärztlichen Praxis in Grafing.



## RESOLUTIONS

Resolved, That the Board of Directors of the  
National Association of Manufacturers be authorized  
to take such action as may be deemed proper.

Resolved, That the Board of Directors be authorized  
to take such action as may be deemed proper in  
the interest of the Association.

Resolved, That the Board of Directors be authorized  
to take such action as may be deemed proper.

Resolved, That the Board of Directors be authorized  
to take such action as may be deemed proper in  
the interest of the Association.

Resolved, That the Board of Directors be authorized  
to take such action as may be deemed proper in  
the interest of the Association.

Resolved, That the Board of Directors be authorized  
to take such action as may be deemed proper.



